

---

**Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. P.C. Weber  
und dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann**

**Untersuchungen zur Funktion von WASp (Wiskott-Aldrich  
Syndrom Protein) bei der Regulation der Aktin Nukleation  
*in vitro* und in primären humanen Makrophagen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Katharina Hübner  
aus Saarbrücken

2004

---

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schleicher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Nelson  
Prof. Dr. Th. Bocker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. S. Linder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10. 2004

---

**Jeder Mensch ist ein Künstler, ob er nun bei der Müllabfuhr ist,  
Krankenpfleger, Arzt, Ingenieur oder Landwirt**

Joseph Beuys (1921 - 1986)

deutscher Aktionskünstler, Kunstpädagoge und Politiker, bedeutendste Werke: "Zeige deine Wunde", "Das Ende  
des 20. Jahrhunderts"

---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

### **Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

#### **-Originalarbeiten:**

1. Linder, S., Higgs, H.N., **Hüfner, K.**, Schwarz, K., Pannicke, U. and Aepfelbacher, M. (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalisation of the Arp2/3 complex. *J. Immunol.* **165**, 221-225.
2. Linder, S.#, **Hüfner, K.#**, Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* **113**, 4165-4176.  
# both authors contributed equally to this manuscript
3. **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D., Aepfelbacher, M. and Linder, S. (2001). The verprolin-like central (VC) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J. Biol. Chem.* **276**, 35761-35767.
4. **Hüfner, K.**, Schell, B., Aepfelbacher, M. and Linder, S. (2001). The acidic regions of WASp and N-WASP can synergize with CDC42Hs and Rac1 to induce filopodia and lamellipodia. *FEBS Lett.* **493**, 168-174.
5. Essler, M., Linder, S., Schell, B., **Hüfner, K.**, Wiedemann, A., Randhan, K., Staddon, J.M. and Aepfelbacher, M. (2003). Cytotoxic necrotizing factor-1 of *E. coli* stimulates Rho/Rho-kinase dependent myosin light chain phosphorylation without inactivating myosin light chain phosphatase in endothelial cells. *Infect. Immun.* **71**, 5188-5193.

#### **-Sekundärliteratur:**

1. **Hüfner, K.** und Linder, S. (2001). Leuchtende Skelette: Fluoreszenz-Färbung und Manipulation des Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen. *Immunologie Aktuell* **5**, 88-94.

#### **-Poster und Vorträge mit gedruckten "Abstracts":**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden darüber hinaus auf mehreren Kongressen in mündlicher und/oder schriftlicher Form vorgestellt. Eine Auflistung findet sich am Ende der Arbeit auf Seite X-XI.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der August-Lenz-Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

# INHALTSVERZEICHNIS

I

## ABKÜRZUNGEN

IV

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Bedeutung der Makrophagen-Migration bei immunologischen Vorgängen</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Das Zytoskelett primärer humaner Makrophagen</b>	<b>3</b>
1.2.1.	Die Rolle des Zytoskeletts bei der Migration	4
1.2.2.	Die Rolle des Zytoskeletts bei der Adhäsion	5
1.2.3.	Regulation des Zytoskeletts durch Rho GTPasen	6
1.2.4.	Das Tubulin-Zytoskelett	7
1.2.5.	Beeinflussung des Tubulin-Zytoskeletts	9
1.2.6.	Das Aktin-Zytoskelett	10
1.2.7.	Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts	11
<b>1.3.</b>	<b>Interaktionen zwischen Aktin- und Tubulin-Zytoskelett</b>	<b>11</b>
1.3.1.	Interaktionen beim Substanztransport in der Zelle	11
1.3.2.	Interaktionen bei der Zell-Polarisation und -Elongation	12
1.3.3.	Interaktionen auf Ebene der fokalen Adhäsionen	12
1.3.4.	Interaktionen auf Ebene der Podosomen	13
<b>1.4.</b>	<b>Grundlagen der Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation <i>in vitro</i> und in Makrophagen</b>	<b>14</b>
1.4.1.	Monomeres Aktin in der Zelle	14
1.4.2.	Mechanismus der zellulären Aktin Nukleation	15
1.4.3.	Arp2/3 Komplex	16
1.4.4.	WASp/Scar-Familie Proteine	18
<b>1.5.</b>	<b>Wiskott-Aldrich Syndrom entsteht durch Mutationen im WASp Gen</b>	<b>20</b>
<b>1.6.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1.</b>	<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</b>	<b>24</b>
<b>2.2.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1.	Allgemeines	24
2.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	25
2.2.3.	Präparation primärer humaner Monozyten	26
2.2.4.	WAS Makrophagen	27
2.2.5.	Adhäsionsversuche	27
2.2.6.	Versuche zur Podosomen-Deassemblierung	27
2.2.7.	Stimulierungsversuche	28
2.2.8.	Gewinnung und Kultur primärer humaner Endothelzellen	28
<b>2.3.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
2.3.1.	Agarose-Gel Elektrophorese und DNS Isolation	29
2.3.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.3.3.	Restriktionsverdau der DNS	30
2.3.4.	Ligation der Konstrukte in Vektoren	31
2.3.5.	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation	32
2.3.6.	Direkte PCR zur Identifikation positiver Klone	32
2.3.7.	Isolierung der Plasmide aus <i>E. coli</i> und Sequenzierung	33
2.3.8.	Einführung von Restriktionsstellen in DNS	33
2.3.9.	“Primer“ der verschiedenen WASp Konstrukte	34
2.3.10.	Nicht selbst hergestellte Konstrukte	36
<b>2.4.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>37</b>
2.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)	37
2.4.2.	Nachweis von Proteinen mit Immunoblot (Western Blot)	38
2.4.3.	Bestimmung von Proteinmengen	39
2.4.4.	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>Escherichia coli</i>	39

2.4.4.1.	Präparation der Proteine für “Pull-down“ Versuche und Mikroinjektion	41
2.4.4.2.	Präparation der Proteine für Nukleations- und Bindungsversuche	41
2.4.4.3.	Besonderheiten bei der Präparation des VC Konstruktes	42
2.4.4.4.	Aufreinigung von “His-Tag“ Proteinen aus <i>Escherichia coli</i>	42
2.4.5.	GST-“Pull-down“ Versuche	42
<b>2.5.</b>	<b>Mikroinjektion</b>	<b>43</b>
<b>2.6.</b>	<b>Immunfluoreszenz und Mikroskopie</b>	<b>44</b>
2.6.1.	Allgemeines	44
2.6.2.	Fixations- und Permeabilisationsverfahren.	44
2.6.3.	Fluoreszenz-Färbungen	45
2.6.3.1.	Färbung mit Phalloidin	45
2.6.3.2.	Färbung mit Antikörpern	47
2.6.3.3.	Mikroskopie und Bildverarbeitung	48
2.6.4.	Quantifizierung des intrazellulären polymerisierten Aktins	49
<b>2.7.</b>	<b>In vitro Bindungs- und Nukleationsversuche</b>	<b>49</b>
2.7.1.	Aufreinigung von Aktin und Arp2/3 Komplex	49
2.7.2.	Vorgehen bei Aktin Nukleationsversuchen im Fluorimeter	50
2.7.3.	Berechnung der Polymerisations-Konstanten	51
2.7.4.	Vorgehen bei Anisotropie Messungen	51
2.7.5.	Berechnung von Bindungs-Konstanten	52
2.7.6.	Observation von Aktin-Filamenten unter dem Licht-Mikroskop	52
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>3.1.</b>	<b>Herstellung der WASp-Polyprolin und -VCA Konstrukte, sowie C-terminaler Trunkationen</b>	<b>55</b>
3.1.1.	Bezeichnung und Herstellung der Konstrukte	55
3.1.2.	“Mapping“ der Konstrukte	56
<b>3.2.</b>	<b>Zelluläre und biochemische Effekte der WASp C-terminalen Regionen</b>	<b>57</b>
3.2.1.	Charakterisierung der WASp-VCA Domäne und weiterer Teildomänen	57
3.2.2.	Anisotropie Messung, Prinzip und Versuchsanordnung	59
3.2.3.	Bestimmung der Bindungsaffinität für Arp2/3 Komplex und Aktin-Monomere	59
3.2.4.	Nukleationsversuche: Prinzip und Versuchsaufbau	62
3.2.5.	Aktivierung von Arp2/3 Komplex durch GST-VC	62
3.2.6.	Direkte Observation von Aktin-Filamenten im Licht-Mikroskop, Prinzip und Versuchsaufbau	64
3.2.7.	WASP-VC Region kann Arp2/3 Komplex zur Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen aktivieren	65
3.2.8.	Zelluläre Antworten auf die Mikroinjektion von GST-Fusionsproteinen der WASp C-terminalen Regionen	67
3.2.9.	GST-VC-induzierte Aktin-Klumpen kolokalisieren mit Arp2/3 Komplex aber nicht mit zellulärem WASp	69
3.2.10.	Veränderung der Netto-Polymerisation von Aktin durch Injektion von GST-VC	71
<b>3.3.</b>	<b>Die Rolle der WASp-A Region bei der Regulation der Aktin Nukleation</b>	<b>73</b>
3.3.1.	Eigenschaften und Funktionen der A Region	73
3.3.2.	WASP-A, N-WASP-A und WAVE-A Konstrukte und ihre Arp2/3 Komplex Bindung	74
3.3.3.	Zelluläre Effekte der GST-A Konstrukte bei Koinjektion mit aktiven GTPasen	76
3.3.4.	Beteiligung von Arp2/3 Komplex bei der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien in primären humanen Makrophagen	79
<b>3.4.</b>	<b>Regulation der Aktin Nukleation in vivo - die Podosomen</b>	<b>81</b>
3.4.1.	Aktin- und Tubulin-Zytoskelett zeigen in primären humanen Makrophagen eine räumliche Nähe	81
3.4.2.	Mikrotubuli sind notwendig für die Ausbildung von Podosomen während der Monozyten-Adhäsion	83
3.4.3.	Podosomen-Neubildung in adhärennten Makrophagen ist abhängig von intakten Mikrotubuli	85
3.4.4.	Mikroinjektion der WASp-Polyprolin Domäne hemmt die Podosomen-Ausbildung	90
3.4.5.	Injektion von CIP4 Deletions-Mutanten hemmt die Podosomen-Ausbildung	93
3.4.6.	Das Tubulin-Zytoskelett wird durch Fehlen der Podosomen nicht beeinflusst	95

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>99</b>
<b>4.1.</b>	<b>Zusammenspiel von WASp C-Terminus und Arp2/3 Komplex bei der Aktin Nukleation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></b>	<b>100</b>
4.1.1.	Abhängigkeit der Nukleations-Aktivierung von der Bindungsaffinität <i>in vitro</i>	100
4.1.2.	Arp2/3 Komplex Aktivierung durch Wasp C-terminale Konstrukte in humanen Zellen	102
4.1.3.	Die VCA Domänen der WASp-Familie Proteine zeigen unterschiedliche Aktivität	104
4.1.4.	Interaktionen der A Regionen von WASp, N-WASP und WAVE/Scar mit Arp2/3 Komplex	105
4.1.5.	GST-A Konstrukte führen zum “Priming“ von Arp2/3 Komplex	106
4.1.6.	Effekt der C-terminalen WASp Konstrukte auf Podosomen, Filopodien und Lamellipodien	107
<b>4.2.</b>	<b>Regulation der Aktin Nukleation in Podosomen durch WASp-Polyprolin Domäne und Mikrotubuli</b>	<b>108</b>
4.2.1.	Abhängigkeit der Podosomen-Bildung von intakten Mikrotubuli	108
4.2.2.	Molekulare Mechanismen der Podosomen-Beeinflussung durch Mikrotubuli	109
4.2.3.	Unterschiede zwischen Podosomen und fokalen Adhäsionen	110
4.2.4.	Beeinflussung der Mikrotubuli durch das Aktin-Zytoskelett	111
<b>4.3.</b>	<b>“Über den Zellrand geschaut“ - erste Analysen zur Funktion von WASp bei der Regulation der Aktin Nukleation in mehrzelligen Organismen</b>	<b>112</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>119</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>VII</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>VIII</b>
	<b>TAGUNGSBEITRÄGE</b>	<b>X</b>

## HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Selten verwendete Abkürzungen sind an entsprechender Stelle im Text erläutert.

A	Ampère
A	Saure (“Acidic”) Region von WASp-Familie Proteinen
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
ADF	“Actin Depolymerising Factor”, Protein, das Aktin-Filamente depolymerisiert
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	dem Aktin ähnliches Protein, (“Actin Related Protein”)
ARPC	“Actin Related Protein Complex”, Name für Untereinheiten des Arp2/3 Komplexes
AS	Aminosäurerest(e)
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (“Bovine Serum Albumine“)
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
C	Zentrale (“Central”) Region von WASp-Familie Proteinen
Ca	Calcium
CD	“Cluster of Differentiation“, Differenzierungsmarker bei Leukozyten
CIP4	mit CDC42 interagierendes Protein (“CDC42 Interacting Protein”)
Cl	Chlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxyd
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N´-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F-	filamentöses, polymerisiertes Aktin
FAK	eine Kinase in fokalen Adhäsionen (“Focal Adhesion Kinase”)
FCH	FES/FPS Homologie Domäne
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FPLC	Säulenchromatographie zum Reinigen von Proteinen (“Fast Performance Liquid Chromatography“)
G-	globuläres, unpolymerisiertes Aktin
g	Gramm
GBD	GTPase-Bindungs Domäne von WASp-Familie Proteinen
GDP	Guanosin-Diphosphat
gew%	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen ) w/v (“Weight per Volume”)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde(n)



H <sub>2</sub> O dest.	Wasser, entionisiert und über Millipore-Filter gereinigt
HCl	Salzsäure
HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethensulfonic-Acid
HUVEC	humane Endothelzellen aus Nabelschnüren ("Human Endothelial Vein Cells")
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der es zu Hemmung von 50% der Nukleation kommt
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
IRSp53	Insulin-Rezeptor Substrat p53
K <sub>d</sub>	Dissoziationsequilibriums-Konstante
KMEI	KCl, MgCl <sub>2</sub> , EGTA, Imidazol Puffer für Nukleationsversuche
l	Liter
μ-	mikro
m	Meter
m-	milli
M	mol/l
mDia1	"Mammalian Homologe of Drosophila Diaphanous" Protein
Mg	Magnesium
min	Minute
n-	nano
N-	Amino-
Na	Natrium
N-WASP	neuronales WASp
O	Ohm
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x
p-	pico
p1-4	1-4. Generation der Endothelzellen seit Beginn der Kultivierung
PAGE	Polyacrylamid-Gel Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ("Phosphate Buffered Saline")
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat
PIPES	Piperazine-N,N'-Bisethensulfonic-Acid
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
RGD	AS Sequenz eines Fibronectin-Peptids
RGDS	AS Sequenz eines Fibronectin-Peptids
rpm	Umdrehungen pro Minute ("Rotations per Minute")
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
Scar	"Supressor of cAMP Receptor" in Dictyostelium, andere Bezeichnung für WAVE
SDS	Natrium-Duodecylsulfat
SH3	Src Homology3 Domäne
SO <sub>4</sub>	Sulfat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS gepufferte, isotonische Salzlösung
TBST	TBS mit 3% TWEEN 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris-Hydroxy-Methyl-Ammoniummethan
TWEEN 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

---

U	Einheit der Enzymaktivität (“Units“)
V	Volt
V	“Verprolin-like“ (Verprolin-ähnliche) Region
VASP	“Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein”
vol%	Volumenprozent (Volumen pro Volumen) v/v
W	Tryptophan
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WAVE	“WASp Family Verprolin Homologous Protein”
WH1	WASp Homologie1 Region von WASp-Familie Proteinen
WH2	WASp Homologie2 Region von WASp-Familie Proteinen
x	mal

**Discovery is seeing what everybody else has seen,  
and thinking what nobody else has thought**

Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986)

ungarischer Mediziner und Forscher, 1937 Nobelpreis für Medizin für seine Untersuchungen im Zusammenhang mit dem biologischen Verbrennungsprozess

## **1. EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG**

### **1.1. Bedeutung der Makrophagen-Migration bei immunologischen Vorgängen**

Unser Immunsystem bewahrt uns vor dem Tod durch Infektion (Alberts *et al.*, 1994). Dabei spielt das Monozyten-Makrophagen-System anerkannter Weise eine sehr wichtige Rolle (Labro, 1998). Im Blut zirkulierende Monozyten befinden sich in Bereitschaft, jederzeit auf Entzündungsreize zu reagieren. Durch Interaktion mit aktiviertem Endothel entwickeln sie die Fähigkeit zur Migration. Daraufhin kommt es im Endothel zur Öffnung von Zell-Zell-Verbindungen als Voraussetzung für die Extravasation (Übersicht bei Johnson-Leger *et al.*, 2000). Dieser Prozess ist im Rahmen einer intakten Immunantwort beim Kontakt des Organismus mit Pathogenen essentiell. Im Gewebe differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus (Takahashi *et al.*, 1996). Bakterielle Abbauprodukte wie LPS locken die Makrophagen an. Als hochspezialisierte Zellen nehmen sie fremdes Material auf, um es anderen Zellen des Immunsystems zu präsentieren. Genetische Defekte der Makrophagen-Migration führen zu schweren angeborenen Immunkrankheiten und zur Anfälligkeit des Organismus besonders gegenüber bakteriellen Infektionen (Jones, 2000).

Andererseits kann eine inadäquate, durch Makrophagen ausgelöste Immunreaktion bei der Verursachung von Krankheiten ursächlich beteiligt sein (Worthylake und Burridge, 2001). Dazu zählen Atherosklerose, Asthma, Psoriasis, Arthritis und Multiple Sklerose (Übersicht bei Rollins, 1996). Bei diesen Krankheiten scheint das “Monocyte Chemoattractant Protein1“ (MCP1) selektiv Makrophagen an den Ort des Geschehens zu lenken (Rollins *et al.*, 1991). Bei der Entstehung der Atherosklerose spielen neben T-Zellen und glatten Muskelzellen Makrophagen eine entscheidende Rolle. In allen Stadien der atherosklerotischen Läsion lassen sich Makrophagen nachweisen (Übersicht bei Hegyi *et al.*, 2001). Es bestehen deutliche Hinweise dafür, dass dabei die Monozyten aus dem Blutstrom durch Extravasation und Migration in der Intima akkumulieren. Dort differenzieren sie zu reifen Makrophagen und werden zu Schaumzellen (Gerrity *et al.*, 1981; Aqel *et al.*, 1984). Chemoattraktive Stoffe wie oxidiertes LDL (Quin *et al.*, 1987) und MCP1 (Cushing *et al.*, 1990) können von den Makrophagen selbst gebildet werden (Pencev und Grotendorst, 1988). Makrophagen produzieren eine wichtige Gruppe von Enzymen: die MMP (Matrix-Metallo-Proteasen).

Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei der Plaqueruptur zugesprochen (Fabunmi *et al.*, 1998).

Auch von nekrotischem Gewebe sezernierte Faktoren locken Makrophagen an. Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist für den Zellumsatz im Gewebe von großer Bedeutung. Weiterhin ist die Elimination dieser Zellen wichtig, um von ihnen ausgesandte proinflammatorische Moleküle zu beseitigen (Platt *et al.*, 1998).

Bei der Bekämpfung von Tumoren spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, selektiv Tumorzellen zu phagozytieren, während sie gesundes Gewebe nicht angreifen (Killian und Fidler, 1994).

Die bei der adäquaten, wie auch bei der überschießenden, makrophagen-spezifischen Immunreaktion ablaufenden Vorgänge, wie Perzeption eines Pathogens, Zell-Polarisation, Migration und Phagozytose, sind alle vom Zytoskelett abhängig und unterliegen einer strengen Regulation.

## **1.2. Das Zytoskelett primärer humaner Makrophagen**

Alle eukaryotischen Zellen haben ein inneres Skelett, ihr Zytoskelett, das der Aufrechterhaltung und Umgestaltung ihrer Zellform dient. Es ermöglicht die Polarisation und Migration und spielt bei der Bewegung von Organellen eine wichtige Rolle. Das Zytoskelett besteht aus mehreren Filamentsystemen, von denen Aktin und Tubulin die wichtigsten sind. Beide müssen während einer sehr frühen Phase der Evolution entstanden sein, da sie beinahe unverändert in allen Eukaryoten vorhanden sind, und Proteine mit ähnlicher Struktur als Vorläufer in Prokaryoten zu finden sind (Sogin, 1991; Übersicht bei Amos *et al.*, 2004). Seit mehreren Jahren ist FtsZ bekannt (Ma *et al.*, 1996), welches in Bakterien zur Ausbildung von Mikrotubuli-ähnlichen Filamenten führt. FtsZ enthält ein Aminosäuremotiv, das auch für eukaryotische Tubuline charakteristisch ist (Übersicht bei Addinall und Holland, 2002). Vor kurzem wurde in Prokaryoten auch ein Aktin Homolog entdeckt: MreB (Van den Ent *et al.*, 2001).

### 1.2.1. Die Rolle des Zytoskeletts bei der Migration

Eine wichtige Funktion des Zytoskeletts bei eukaryotischen Zellen ist es, durch die Ausbildung von Pseudopodien Fortbewegung zu ermöglichen. Pseudopodien sind Zellstrukturen mit unterschiedlicher Morphologie. Sie bestehen sowohl aus Lamellipodien, flachen lamellären Ausstülpungen mit Matrix-Adhäsion (viele kleine, gleichzeitig auftretende Lamellipodien ohne Adhäsionsstrukturen werden auch "Ruffles" genannt), als auch aus Filopodien, fadenförmigen, spitzen Ausziehungen des Zellkörpers (Übersicht bei Adams, 2001; Nabi, 1999). In mehrzelligen Organismen hängen viele verschiedene Vorgänge von der Migration einzelner Zellen ab: die Wanderung von Neuronen während der Entwicklung, von Fibroblasten während der Wundheilung oder von Immunzellen während der Immunantwort (Übersicht bei Pollard *et al.*, 2000). Letzteres soll nun im Folgenden weiter charakterisiert werden.

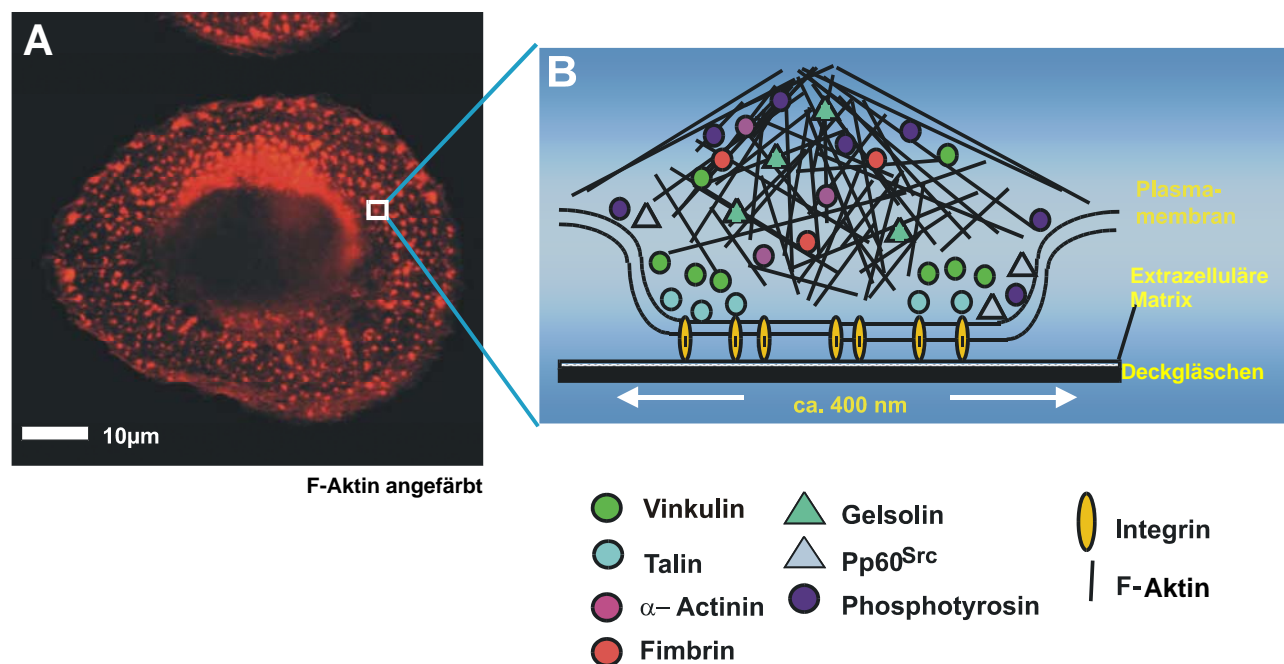
Durch die Stimulation mit einem chemoattraktiven Stoff verändert sich bei Makrophagen die Zellmorphologie. Zuerst kommt es zu einer Polarisation der Zellen: mit Hilfe der Filopodien nehmen sie einen chemoattraktiven Gradienten wahr (Jones *et al.*, 1998) und es kommt zur Ausbildung von Lamellipodien durch Aufbau eines spezialisierten Netzes aus Aktin-Filamenten am vorderen Teil der Zelle ("Leading Edge"). In diesem Teil der Zelle müssen neue Adhäsionsstrukturen gebildet werden. Die kürzlich entdeckte Bindung von Arp2/3 Komplex, einem Protein welches eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Aktin-Filamenten spielt (siehe Abschnitt 1.4.3.) an Vinkulin, ein Protein das in Adhäsionsstrukturen vorkommt (DeMali *et al.*, 2002), könnte ein wichtiger Mechanismus der Verankerung neuer Lamellipodien mit dem Substrat sein (Craig und Chen, 2003). Am nachwandernden "Trailing Edge" werden bestehende Adhäsionsstrukturen aufgelöst. Schlussendlich wird der hintere Zellteil nachgezogen (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

Für die Fortbewegung einer Zelle müssen Adhäsions- und Protrusions-Kompartimente räumlich voneinander getrennt werden. Diese Aufgabe kommt dem Tubulin-Zytoskelett zu (Vasiliev und Gelfand, 1976). Die Rolle von Mikrotubuli besteht also in der Polarisierung beweglicher Zellen und damit in der Auswahl der Migrationsrichtung (Tanaka und Sabry, 1995). Dabei erfolgt die Wirkung der Mikrotubuli offenbar nicht über einen direkten Kontakt mit der Plasmamembran der Pseudopodien (Rosania und Swanson, 1996). Darüber hinaus ist die Retraktion des nachwandernden Teils der Zelle ("Trailing Edge") nur in Anwesenheit von intakten Mikrotubuli möglich (Ballestrem *et al.*, 2000).

Es soll auch darauf hingewiesen werden, dass intakte Intermediär-Filamente für die Ausbildung von Zellform oder für die Zell-Wanderung nicht unabdingbar sind (Fuchs und Cleveland, 1998).

### 1.2.2. Die Rolle des Zytoskeletts bei der Adhäsion

Primäre humane Makrophagen besitzen neben den in vielen Zellarten vorkommenden fokalen Adhäsionen noch eine weitere Klasse von Strukturen, die an der Adhäsion mit beteiligt sind: die Podosomen. Diese sind füßchenartige Protrusionen der Plasmamembran, die extrazellulär mit Integrin- und Komplement-Rezeptoren und intrazellulär mit Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen assoziiert sind (Tarone *et al.*, 1985; Zamboin-Zallone *et al.*, 1989). Sie befinden sich im ventralen Teil der Zelle und sind ringförmig in der Zellperipherie angeordnet (Abb.1.1., A). Bei einem reifen, 50  $\mu\text{m}$  großen Makrophagen beträgt der Durchmesser eines Podosoms ca. 400 nm (Abb.1.1., B).



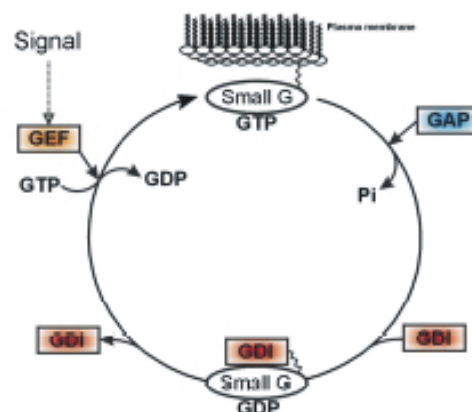
**Abb.1.1. Aktin-Zytoskelett eines primären humanen Makrophagen und Aufbau spezifischer Adhäsionsstrukturen, der Podosomen**

(A) Primärer humaner Makrophage, sechs Tage alt. Aktin-Zytoskelett mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt. Prominent erscheinen die punktartigen Adhäsionsstrukturen, die Podosomen, die sich an der Ventralseite der Zelle befinden. Weißer Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Schematischer Aufbau eines Podosoms in der Vergrößerung. Es handelt sich um eine Ausstülpung der ventralen Plasmamembran mit einem dichten Aktin-Netzwerk und vielen Aktin-assoziierten Proteinen. Verbindungen zur extrazellulären Matrix werden über Integrine vermittelt. (B) modifiziert aus Gavazzi *et al.*, 1989.

Podosomen werden auch in anderen Zellen gefunden: bei Osteoklasten dienen sie der Adhäsion am Knochen und sind mit beteiligt am Abbau der Knochenmatrix (Babb *et al.*, 1997; Chen, 1989; Machisio *et al.*, 1984). In Fibroblasten lassen sich Podosomen durch Transformation mit Viren wie z.B. Rous Sarcoma Virus induzieren (Tarone *et al.*, 1985; Mizutani *et al.*, 2002). In humanen vaskulären Endothelzellen wurde das Auftreten von Podosomen nach Stimulation mit einem bakteriellen Toxin ("Cytotoxic Necrotizing Factor", CNF) beschrieben (Moreau *et al.*, 2003). Glatte Muskelzellen können podosomenähnliche Strukturen nach Behandlung mit Phorbol Dibutyrate ausbilden (Hai *et al.*, 2002). Auch in malignen Zellen, wie z.B. bei Mammakarzinom-Zellen oder malignen B-Lymphozyten (Marchisio *et al.*, 1987), können Podosomen auftreten (Übersicht bei Linder und Aepfelbacher, 2003). In diesen Zellen werden sie mit der Invasivität und dem Metastasierungspotential der Tumoren in Verbindung gebracht (Yamagata und Kimata, 1994; Übersicht bei Worthylake und Burridge 2001). Die Fähigkeit der Podosomen, extrazelluläre Matrix zu degradieren, könnte dazu beitragen (Mizutani *et al.*, 2002; Linder und Aepfelbacher, 2003).

### 1.2.3. Regulation des Zytoskeletts durch Rho GTPasen

Zentrale Regulatoren des Zytoskeletts sind die kleinen GTPasen aus der Familie der Rho Proteine (Nobes und Hall, 1995). Diese können zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand hin- und herwechseln (Übersicht bei Ridley, 2001) (Abb.1.2.). In ihrem aktiven Zustand können sie mit Effektorproteinen interagieren und so Signale weiterleiten (Übersicht bei Symons und Settleman, 2000).



**Abb.1.2. Funktionszyklus der GTPasen**

GAPs ("GTPase Activating Protein") stimulieren die niedrige intrinsische GTPase Aktivität, um einen Übergang von der GTP-gebundenen in die GDP-gebundene Form zu erreichen. GDIs ("Guanine Nucleotide Dissociation



Inhibitor“) verhindern die Dissoziation von GDP von der GTPase und halten die GTPase so in einem inaktiven Zustand. GEFs (“Guanine Nucleotide Exchange Factor“) katalysieren nach ihrer Aktivierung die Bindung von GTP an die GTPasen und führen so zu ihrer Aktivierung. Aus Paduch *et al.*, 2001.

GTPasen spielen bei der Zell-Migration eine wichtige Rolle. Dabei ist die GTPase CDC42 essentiell für die Ausbildung von Aktin-Strukturen wie Filopodien, mit denen Makrophagen chemoattraktive Gradienten wahrnehmen (Allen *et al.*, 1998; Cory *et al.*, 2002). Über Aktivierung der kleinen GTPase Rac werden aktinhaltige Lamellipodien induziert (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall, 1992; Miki *et al.*, 2000), während die Kontraktion des nachwandernden Zellteils durch die GTPase Rho gesteuert wird (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). Dabei beeinflussen die GTPasen nicht nur das Aktin-Zytoskelett. Auch Mikrotubuli werden von CDC42, Rac und Rho in ihrer Stabilität beeinflusst (Palazzo *et al.*, 2001; Daub *et al.*, 2001; Etienne-Manneville und Hall, 2001). Man vermutet, dass bei der Regulation der Mikrotubuli die Phosphorylierung eine wichtige Rolle spielt (Übersicht in Wittmann und Waterman-Storer, 2001).

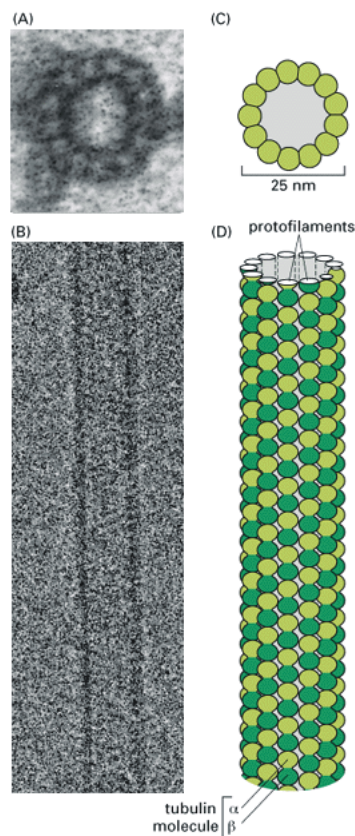
Auch Adhäsionsstrukturen werden über kleine GTPasen beeinflusst. So werden fokale Adhäsionen durch Rho induziert (Enomoto, 1996), und in den Podosomen von primären humanen Makrophagen lässt sich CDC42 nachweisen (Linder *et al.*, 1999).

In letzter Zeit ist klar geworden, dass die Regulation des Zytoskeletts auf vielen Ebenen vernetzt ist. Dies wird schon auf Ebene der GTPasen deutlich. So induziert Rac über IRSp53 die Ausbildung von Lamellipodien (Miki *et al.*, 2000), aber auch CDC42 aktiviert IRSp53 und benutzt es zur Weitergabe von Signalen (Govind *et al.*, 2001). In einer “Yeast-two-Hybrid“ Untersuchung wurden eine Vielzahl potentieller Vernetzungen zwischen den Rho und CDC42 Signal-Kaskaden identifiziert (Drees *et al.*, 2001), wobei die physiologische Relevanz dieser Interaktionen noch weiter untersucht werden muss.

#### 1.2.4. Das Tubulin-Zytoskelett

Mikrotubuli sind unentbehrlich bei der Zellteilung. Aber auch für die Aufrechterhaltung einer intakten Zellform, für Polarisation und Zell-Migration, sowie für den Transport von Molekülen in der Zelle, ist ihre Funktionstüchtigkeit essentiell. Diese vielfältigen Aufgaben können nur durch die Interaktion einer Vielzahl von Molekülen mit den Mikrotubuli ermöglicht werden (Hirokawa *et al.*, 1998).

Mikrotubuli sind Polymere, die aus Heterodimeren von jeweils  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind (Abb.1.3.). Die Assemblierung von Mikrotubuli aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten ist nur möglich, wenn diese im GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Ein Mikrotubulus-Zylinder besteht aus 13 Protofilamente (Abb.1.3., C,D), sein Durchmesser beträgt im Normalfall zwischen 18 und 25 nm. Mikrotubuli besitzen eine intrinsische Polarität: Das schnell wachsende (+) Ende des Mikrotubulus wächst ca. dreimal schneller als das langsam wachsende (–) Ende (Hyams und Lloyd, 1993). Die Hydrolyse von GTP am  $\beta$ -Tubulin schwächt die Bindung der Untereinheiten aneinander und bahnt so den Weg für die spontane Desaggregation. GTP-Tubulin-Untereinheiten an beiden freien Enden („GTP Cap“) verhindern die spontane Deassemblierung der Mikrotubuli (Übersicht bei Dustin, 1984).



**Abb.1.3. Aufbau der Mikrotubuli**

(A) Elektronen-mikroskopische Aufnahme eines Mikrotubulus in der Aufsicht. Deutlich zu erkennen sind 13 Untereinheiten, die jeweils ein  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimer darstellen. (B) Kryoelektronen-mikroskopische Aufnahme eines *in vitro* polymerisierten Mikrotubulus. (C,D) ist eine schematische Darstellungen von (A) und (B). Einzelne Heterodimere bauen einen vollständigen Mikrotubulus-Zylinder auf. (C) Aufsicht auf einen solchen Hohlzylinder. (D) Seitenansicht eines kurzen Abschnitt eines Mikrotubulus. Man erkennt die einzelnen Protofilamente, die jeweils um ein Monomer versetzt sind und einen Mikrotubulus-Zylinder aufbauen. Aus Alberts *et al.*, 1994.

Dennoch sind Mikrotubuli-Polymere sehr instabil. Kommt es zum spontanen Verlust der GTP-Kappe an einem freien Ende oder wachsen die Mikrotubuli langsamer als die GTP

Hydrolyse am (+) Ende stattfindet, so zerfallen sie sofort (Mitchison und Kirschner, 1984) ("Dynamic Instability", = dynamische Instabilität). Diese Instabilität der Mikrotubuli scheint in der Zelle für die Ausbildung von Direktionalität und Polarisation von extremer Bedeutung zu sein (Gelfand und Bershadsky, 1991).

### 1.2.5. Beeinflussung des Tubulin-Zytoskeletts

In der Anwesenheit von Mikrotubuli Inhibitoren verlieren Zellen ihre Fähigkeit zu polarisieren (Vasiliev and Gelfand, 1976). Bei der morphologischen Betrachtung von mit Mikrotubuli Inhibitoren behandelten Zellen stellt man fest, dass die Protusion von Lamellipodien auch nach Destruktion des Tubulin-Zytoskeletts prinzipiell noch erfolgen kann (Ballstrem *et al.*, 2000). Sie ist aber stark reduziert, und die Fortbewegung der Zellen in eine bestimmte Richtung unterbleibt (Dunn *et al.*, 1997; Vasiliev und Gelfand, 1976). Allerdings ist eine ungerichtete Fortbewegung, zumindest von Zellteilen, weiterhin möglich (Euteneuer und Schliwa, 1984).

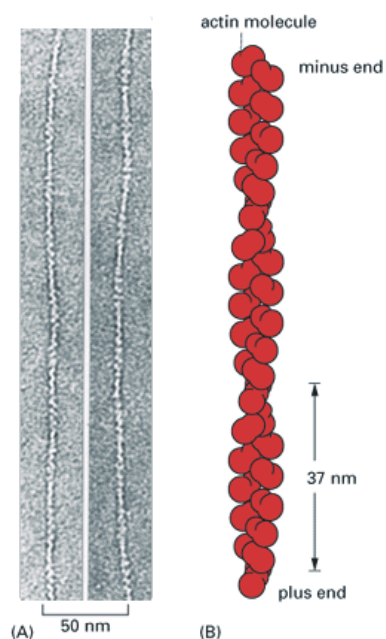
Die Stabilität von Mikrotubuli lässt sich durch mehrere Substanzen verändern, die zum Teil auch therapeutische Anwendung finden. Colchizin, Vinblastin, Nocodazol und Benomyl führen alle zu einer Depolymerisation, wobei die Mechanismen jedoch unterschiedlich sind (Übersicht über Tubulin-bindende Substanzen bei Hamel, 1996). Colchizin ist die älteste bekannte Mikrotubuli-bindende Substanz. Es bindet vorwiegend an die  $\beta$ -Untereinheit der Mikrotubuli (Uppuluri *et al.*, 1993) und führt so zu einer Konformationsänderung dieser Untereinheit. Man geht davon aus, dass viele Substanzen, die die Stabilität der Mikrotubuli beeinflussen, an der  $\beta$ -Untereinheit angreifen, da an dieser die GTP Hydrolyse stattfindet, von der die Stabilität der Mikrotubuli abhängig ist. Vinblastin und andere Vinca Alkaloide führen zur Ausbildung von Parakristallen im Zytoplasma (Rai und Wolff, 1996; Takanari *et al.*, 1990). Nocodazol bindet sowohl Tubulin-Dimere als auch -Polymere und verhindert durch eine Konformationsänderung im Tubulin die Polymerisierung (Lee *et al.*, 1980). Benzamidazole, zu denen auch Benomyl gehört, werden in der antifungalen Therapie eingesetzt. Ihre genaue Bindungsstelle am Tubulin ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass auch hier die Bindung an  $\beta$ -Tubulin von Bedeutung ist (Reijo *et al.*, 1994).

Taxol bindet  $\beta$ -Tubulin und führt über eine Imitation der GTP-gebundenen Situation zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli (Schiff und Horwitz, 1980; Nogales *et al.* 1999). Taxol und

seine synthetischen Derivate finden in der Tumorthherapie Anwendung (Übersicht bei Eisenhauer und Vermorken, 1998).

### 1.2.6. Das Aktin-Zytoskelett

Aktin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und ist mit 5% der zellulären Proteinmenge (20% in Muskelzellen) das in der höchsten Konzentration vorkommende zelluläre Protein (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Ein Aktin-Filament besitzt Elektronen-mikroskopischen Untersuchungen zufolge eine Dicke von ca. 8 nm (Kabsch und Vandekerckhove, 1992).



**Abb.1.4. Aufbau der Aktin-Filamente**

(A) Elektronen-mikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten Aktin-Filamenten. (B) Schematische Darstellung der schraubenförmigen, spiraligen Anordnung der Aktin-Untereinheiten im Aktin-Filament. Aus Alberts *et al.*, 1994.

Aktin-Monomere werden auch G-Aktin (für “Globular“) genannt. Aktin-Filamente (F-Aktin) besitzen genau wie Mikrotubuli eine intrinsische Polarität (Abb.1.4.). Das schnellwachsende Ende des Filaments heißt “Barbed End“ oder (+) Ende, das langsam wachsende Ende wird “Pointed End“ oder (-) Ende genannt. Der Unterschied zwischen dem (+) und dem (-) Ende ist ausgeprägter als bei Mikrotubuli: das “Barbed End“ wächst bis zu zehnmal schneller als das langsame “Pointed End“ (Bonder *et al.*, 1983). Diese Filamente sind viel dünner, biegsamer

und meist kürzer als Mikrotubuli. Die Elongation von Aktin-Filamenten am “Barbed End“ ist für die Ausbildung von Pseudopodien essentiell. Dabei inseriert das (+) Ende der Aktin-Filamente am “Leading Edge“ in die Plasmamembran (Tilney *et al.*, 1981). Die gesamte Länge des Aktin-Zytoskeletts einer Zelle ist ungefähr 30-mal länger als die des Tubulin-Zytoskeletts, was auf einen fundamentalen Unterschied in der Organisation dieser zwei Zytoskelett-Anteile hindeutet (Alberts *et al.*, 1994).

### **1.2.7. Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts**

Substanzen, die Aktin-Filamente stabilisieren oder destabilisieren, sind wichtige Werkzeuge zur Untersuchung dynamischer Zellprozesse. Cytochalasine sind Pilzprodukte, die Aktin Nukleation verhindern, indem sie an das (+) Ende von Aktin-Filamenten binden. Phalloidine sind Gifte aus dem *Amanita* Pilz. Sie binden mit hoher Affinität an die Seite von Filamenten und stabilisieren sie so gegen Depolymerisation. Nach Behandlung mit Aktin-stabilisierenden oder –destabilisierenden Substanzen ist die Zell-Migration völlig aufgehoben, da keine Lamellipodien mehr ausgebildet werden können (Cooper, 1987).

## **1.3. Interaktionen zwischen Aktin- und Tubulin-Zytoskelett**

Die verschiedenen Anteile des Zytoskeletts, Aktin, Mikrotubuli und Intermediär-Filamente wurden lange Zeit als völlig unabhängig voneinander betrachtet, und jeder Zytoskelett-Komponente wurden spezifische Funktionen zugeordnet. Inzwischen wurde diese Auffassung aber von neueren Daten widerlegt, die eine Interaktion zwischen Aktin- und Tubulin-Zytoskelett auf vielen Ebenen und bei vielen Mechanismen beschreiben. Auch Intermediär-Filamente scheinen bei diesem Zusammenspiel mitzuwirken (Übersicht bei Goode *et al.*, 2000).

### **1.3.1. Interaktionen beim Substanztransport in der Zelle**

Mikrotubuli sind eher für den Transport über längere Strecken notwendig, während Aktin den Transport über kurze Entfernungen bewerkstelligt (Langford, 1995). Dabei gibt es aber

durchaus Überlappungen. Inzwischen wurden auch Proteine beschrieben, die diese funktionelle Interaktion zwischen beiden Zytoskelett-Bestandteilen strukturell bestätigen. So ist MACF ein zytoskelettales Verbindungsprotein, das sowohl eine Aktin- als auch eine Mikrotubuli-Bindungsstelle hat (Bernier *et al.*, 2000). Von Endosomen ist bekannt, dass sie sowohl mit den Motorproteinen der Mikrotubuli (Kinesin und Dynein) als auch mit den Myosin Motoren der Aktin-Filamente assoziieren können (Apodaca, 2001).

### **1.3.2. Interaktionen bei der Zell-Polarisation und -Elongation**

In den Lamellipodien migrierender Zellen kommt es zur Neu-Polymerisation sowohl von Mikrotubuli (Waterman-Storer *et al.*, 1999) als auch von Aktin-Filamenten (Übersicht bei Welch und Mullins, 2002). Da sowohl das Aktin- als auch das Tubulin-Zytoskelett für die Zell-Migration notwendig sind, ist es naheliegend, dass die Aktivitäten der beiden Zytoskelett-Anteile koordiniert werden müssen. Dabei sind die Proteine IQGAP1 und CLIP-170 von Bedeutung (Fukata *et al.*, 2002). IQGAP1 erhält Signale von Rac und CDC42 (Kuroda *et al.*, 1996) und bindet Aktin-Filamente (Fukata *et al.*, 1997). CLIP-170 bindet spezifisch an die (+) Enden von Mikrotubuli und durch seine Interaktion mit dem Aktin-bindenden IQGAP1 stabilisiert es Mikrotubuli am “Leading Edge“ der Zelle (Fukata *et al.*, 2002).

mDia1 ist ein Protein aus der Formin-Familie. Nach Aktivierung über die GTPase Rho führt es zur Ausbildung von parallelen Aktin Bündeln und zur Zell-Elongation (Watanabe *et al.*, 1997). In neueren Studien wurde gezeigt, dass mDia1 auch Mikrotubuli in eine parallele Anordnung bringt, ausgerichtet an der Längsachse der Zelle. Diese Aktin- und Mikrotubuli-Stränge enden an Adhäsionsstrukturen, die mDia1 und fokale Adhäsionen enthalten (Ishizaki *et al.*, 2001). Die Beeinflussung der Aktin Nukleation durch mDia1 ist in Abschnitt 1.4.3. näher dargestellt. Auf welche Art und Weise mDia1 Mikrotubuli beeinflusst, ist zur Zeit noch unklar.

### **1.3.3. Interaktionen auf Ebene der fokalen Adhäsionen**

Fokale Adhäsionen sind in fast allen adhärenenten Zellen vorhanden. Sie dienen dem Kontakt der Zelle zur extrazellulären Matrix und bestehen aus einer Vielzahl spezifischer Proteine,

unter anderem Vinkulin, Talin und FAK (= Kinase in fokalen Adhäsionen, “Focal Adhesion Kinase”; Flinn und Ridley, 1996). Durch Kontakt zwischen zellulären Integrin-Domänen und Molekülen der extrazellulären Matrix kommt es zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen (Craig und Johnson, 1996).

Die Zerstörung von Mikrotubuli führt zur Aktivierung der kleinen GTPase Rho. Dies bewirkt zum Einen ein Wachstum der vorhandenen fokalen Adhäsionen, aber auch ihre zahlenmäßige Zunahme (Bershadsky *et al.*, 1996). Inzwischen ist bekannt, dass Mikrotubuli in einem höchstwahrscheinlich gerichteten Prozess fokale Adhäsionen kontaktieren können (Kaverina *et al.*, 1998). Dieses “Targetting“ führt zu einer Auflösung der fokalen Adhäsionen. Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Mechanismus bei der Polarisierung von Zellen sehr wichtig ist (Übersicht bei Kaverina *et al.*, 2002). So kommen am “Trailing Edge“ mehr Kontaktierungen von Mikrotubuli an fokale Adhäsionen vor. Dies führt zu einem verminderten Haften dieses Zellteils an der extrazellulären Matrix. Am vorausgehenden Ende der Zelle kommen solche Kontaktierungen seltener vor, so dass hier die Neu-Ausbildung von fokalen Adhäsionen gefördert wird (Kaverina *et al.*, 1999). Andererseits üben fokale Adhäsionen ihrerseits einen Einfluss auf Mikrotubuli aus. So sollen sie a) Mikrotubuli Enden einfangen und sie gegen Depolymerisierung schützen und b) als bevorzugte Orte der Mikrotubuli Neu-Polymerisierung dienen (Kaverina *et al.*, 1998).

#### **1.3.4. Interaktionen auf Ebene der Podosomen**

Auch Podosomen, die fokalen Adhäsionen in einigen Eigenschaften gleichen, scheinen durch Mikrotubuli beeinflusst zu werden. So führt die Zerstörung des Tubulin-Zytoskeletts in Osteoklasten zu einer Umverteilung der Podosomen. In intakten Osteoklasten befinden sich die Podosomen in einem Ring in der Zellperipherie. Nach Zerstörung der Mikrotubuli verschwindet diese organisierte Anordnung und die Podosomen sind nun über die ganze Ventralfläche der Zelle verteilt (Babb *et al.*, 1997). Auch MNGCs (“Mononucleated Giant Cells“), die aus peripheren Monozyten bei Affen gewonnen wurden, weisen Podosomen auf. Nach Zerstörung des Tubulin-Zytoskeletts in diesen Zellen kommt es zu einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts: Podosomen werden aufgelöst und es entstehen Stress-Fasern und fokale Adhäsionen (Ory *et al.*, 2002).

## 1.4. Grundlagen der Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation *in vitro* und in Makrophagen

### 1.4.1. Monomeres Aktin in der Zelle

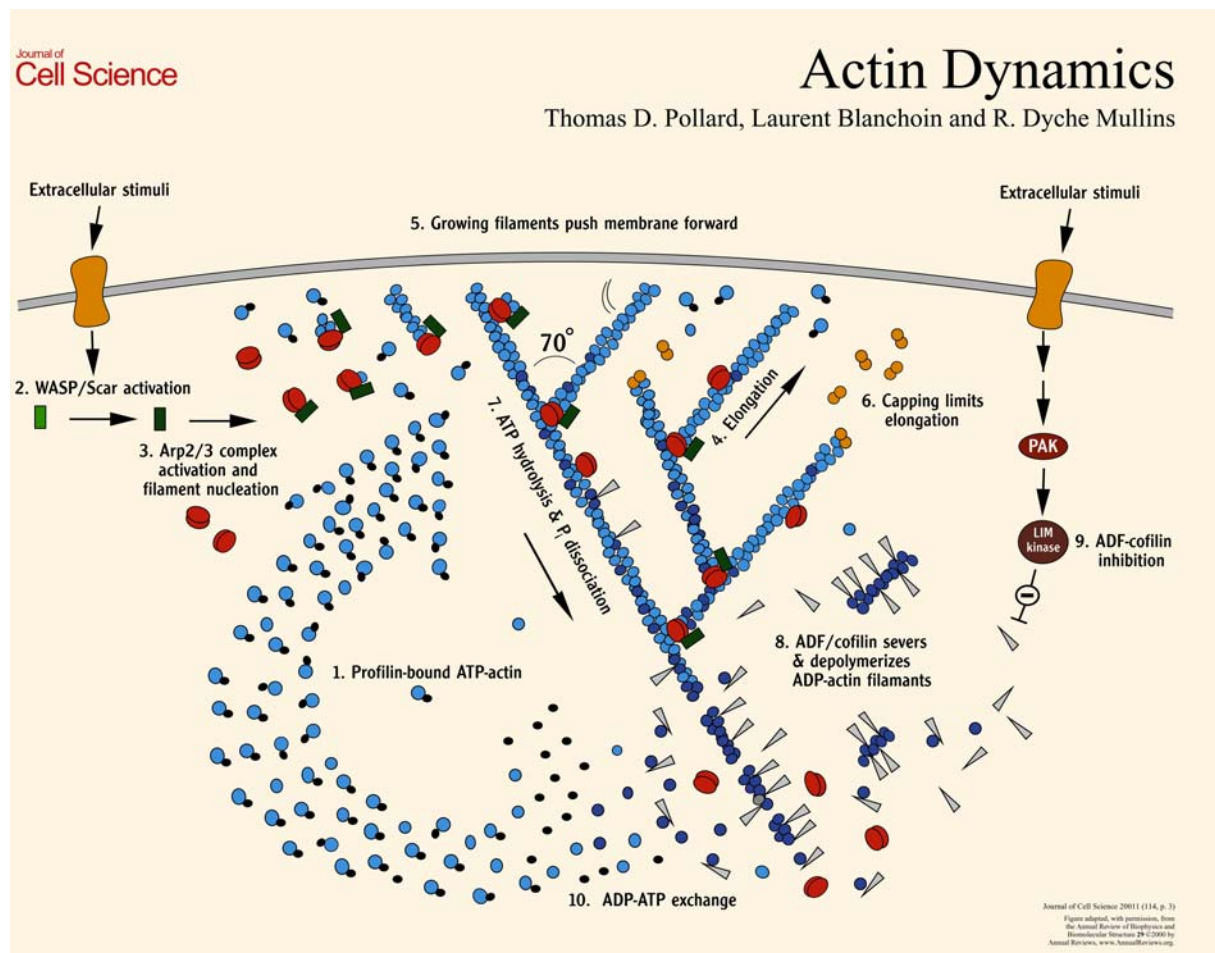
Die Konzentration von freien Aktin-Monomeren in Neutrophilen wird auf ca. 300  $\mu\text{M}$  geschätzt (DiNubile *et al.*, 1995). Das meiste davon sind  $\text{Mg}^{2+}$ -Monomere, die ATP gebunden haben. Diese hohe Konzentration von  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ -Monomeren ist verwunderlich, wenn man bedenkt, dass die kritische Konzentration für  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ -Monomere bei 0.1  $\mu\text{M}$  am schnell wachsenden “Barbed End“ und 0.6  $\mu\text{M}$  am langsam wachsenden “Pointed End“ liegt (Pollard, 1999). Das heißt veranschaulicht, dass bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  reinem Aktin in einem physiologischen Puffer in Sekundenschnelle alles freie Aktin bis auf 0.1  $\mu\text{M}$  polymerisiert. Um den großen Pool an unpolymerisierten Monomeren aufrecht zu erhalten, hat die Zelle mehrere Möglichkeiten entwickelt: einerseits werden Monomere an Proteine gebunden und so der Polymerisation entzogen, andererseits können freie Enden von Filamenten durch “Capping“ (= Kappen) Proteine vor der Addition weiterer Monomere geschützt werden. Für den ersten Mechanismus, das Binden von freien Monomeren, stehen in Säugerzellen hauptsächlich zwei Proteine zur Verfügung: Thymosin  $\beta 4$  (Safer und Nachmias, 1994) und Profilin (Blanchoin und Pollard, 1998). Profilin-gebundene Monomere können nur am “Barbed End“ elongieren, aber keine neue Nukleation initiieren (Pring *et al.*, 1992). Das Schützen von freien “Barbed Ends“ der Filamente erfolgt durch “Capping“ Protein (Schafer *et al.*, 1996) und Gelsolin (Blanchoin *et al.*, 2000b), freie “Pointed Ends“ können durch Arp2/3 Komplex (siehe Abschnitt 1.4.3.) vor der Addition weiterer Monomere bewahrt werden (Mullins *et al.*, 1998).

Die Spaltung von ATP bei der Aktin Nukleation ist analog der Hydrolyse von GTP bei der Mikrotubuli Polymerisation. Sie ist nicht für die Ausbildung des Filaments essentiell, sondern schwächt die Bindung zwischen den Untereinheiten und fördert so die Depolymerisation (Teubner und Wegner, 1998). Der Austausch von ADP gegen ATP ist bei monomerem Aktin relativ langsam und wird durch Profilin katalysiert (Halbwertszeit im Minutenbereich) (Blanchoin und Pollard, 1998). Im Gegensatz dazu erfolgt der GDP zu GTP Austausch bei Tubulin-Monomeren viel schneller (Halbwertszeit im Sekundenbereich). Die langsamere Regeneration der Aktin-Monomere führt zu einer Verzögerung, bis diese Monomere wieder in ein Filament eingebaut werden können und trägt so mit dazu bei, freies Aktin in der Zelle bereitzustellen.



### 1.4.2. Mechanismus der zellulären Aktin Nukleation

Zellen müssen in der Lage sein, ihre Aktin Nukleation an die Anforderung ihrer Umgebung anzupassen, d.h. zum Beispiel die Migrationsrichtung in einer kurzen Zeitspanne zu ändern. Die spontane Ausbildung von Aktin-Filamenten in der Zelle ist aber ein energetisch sehr ungünstiger Vorgang und für diese Anforderungen nicht ausreichend. Bei der Nukleation muss G-Aktin zuerst ein energetisch ungünstiges Dimer und Trimer Stadium überwinden, bevor die Nukleation zu Filamenten stattfinden kann (Pollard und Cooper, 1984).



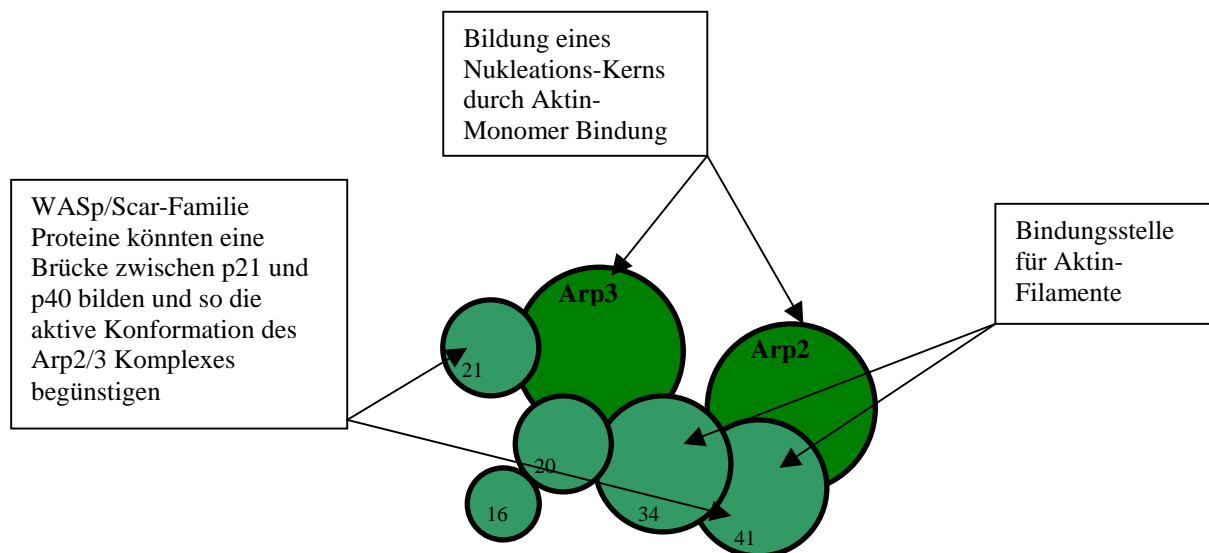
**Abb.1.5. Modell der Aktin Nukleation (“Dentritic Nucleation Model“) und Depolymerisierung *in vivo* (Übersicht, Details siehe Text)**

In der Abwesenheit von freien “Barbed Ends“ befinden sich die zytoskelettalen Bestandteile in einem metastabilen Zustand, bereit für die Assemblierung (1). Durch aktivierte Proteine der WASp-Familie (2) wird der Arp2/3 Komplex aktiviert, der daraufhin mit konstanter Geschwindigkeit neue “Barbed Ends“ bereitstellt (3). Diese Filamente wachsen schnell (4) und führen zur Protrusion der Plasmamembran (5). Nach kurzer Zeit wird das Wachstum der “Barbed Ends“ durch “Capping“ beendet (6). Dieses System ist also von einer kontinuierlichen Aktivierung des Arp2/3 Komplexes abhängig. Nachfolgende Hydrolyse von ATP am Aktin-Filament (7) führt zum Abbau älterer Filamente durch ADF/Cofilin (8). Nukleotid-Austausch durch Profilin überführt die Aktin-Untereinheiten wieder in den ATP-Monomer Pool (10). Aus Pollard *et al.*, 2001.

Zellen haben deshalb unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um die Ausbildung von Aktin-Filamenten zu initiieren: 1) “Uncapping“ (= Freilegen) von bereits existierenden “Barbed Ends“, 2) Aufbrechen von bereits existierenden Filamenten, um so freie “Barbed Ends“ zu schaffen oder 3) *de novo* Nukleation von Filamenten aus monomerem Aktin (Higgs und Pollard, 1999). Alle drei Mechanismen wurden in Zellen nachgewiesen, wobei jedoch der *de novo* Nukleation besondere Bedeutung zuzukommt (Abb.1.5.). In der Zelle dient der aktivierte Arp2/3 Komplex als Nukleations-Zentrum für neue Filamente, wie im Folgenden näher erläutert wird.

### 1.4.3. Arp2/3 Komplex

Arp2/3 Komplex ist ein stabiler Proteinkomplex, der aus sieben Untereinheiten besteht (Abb.1.6.): zwei “Actin Related Proteins“ (= Aktin verwandte Proteine) Arp2 und Arp3 und fünf neuen Proteinen (Machesky *et al.*, 1994; Übersicht bei Mullins und Pollard, 1999). Arp2/3 Komplex kommt in Zellen in hoher Konzentration vor, ca. 2  $\mu$ M (Kelleher *et al.*, 1995), ist lebensnotwendig (Schwob und Martin, 1992), und zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert (Welch *et al.*, 1997).



#### Abb.1.6. Aufbau und Struktur des Arp2/3 Komplexes (inaktiver Zustand)

Schematische Struktur des Arp2/3 Komplexes: die Daten sind aus Elektronen-Mikroskopie (Mullins *et al.*, 1998; Voormann *et al.*, 2001), Kristall-Mikroskopie (Robinson *et al.*, 2001), Nachbarschafts-Analysen aus chemischer Vernetzung (Mullins und Pollard, 1999) und "Yeast-two-Hybrid Screen" (Machesky und Insall, 1998) abgeleitet. Arp2/3 Komplex ist ein stabiler Proteinkomplex, der aus sieben Untereinheiten besteht: zwei “Actin Related Proteins“ (= Aktin verwandte Proteine) Arp2 und Arp3 und fünf neuen Proteine (p41 (ARPC1), p34 (ARPC2), p21 (ARPC3), p20 (ARPC4) und p16 (ARPC5)). Die postulierten Bindungsstellen für Aktin-Monomere,

WASp/Scar-Familie Proteine und Aktin-Filamente sind markiert. Nach Mullins und Pollard, 1999 und May, 2001.

Arp2/3 Komplex ist der effektivste bekannte Aktin Nukleator, er ist aber im Grundzustand inaktiv (Welch *et al.*, 1998). Erst eine Aktivierung des Komplexes durch Proteine der WASp/Scar-Familie kann die Bildung von neuen Aktin-Filamenten signifikant erhöhen (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999). Durch die Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung im Komplex wodurch die, im inaktiven Zustand räumlich getrennten, Proteine Arp2 und Arp3 einander angenähert werden (Kelleher *et al.*, 1995; Volkman *et al.*, 2001). Es wird postuliert, dass Arp2 und Arp3 im aktiven Zustand ein Heterodimer bilden, das einem Aktin-Dimer gleicht und somit als Nukleations-Kern für ein neues Aktin-Filament dienen kann (Robinson *et al.*, 2001).

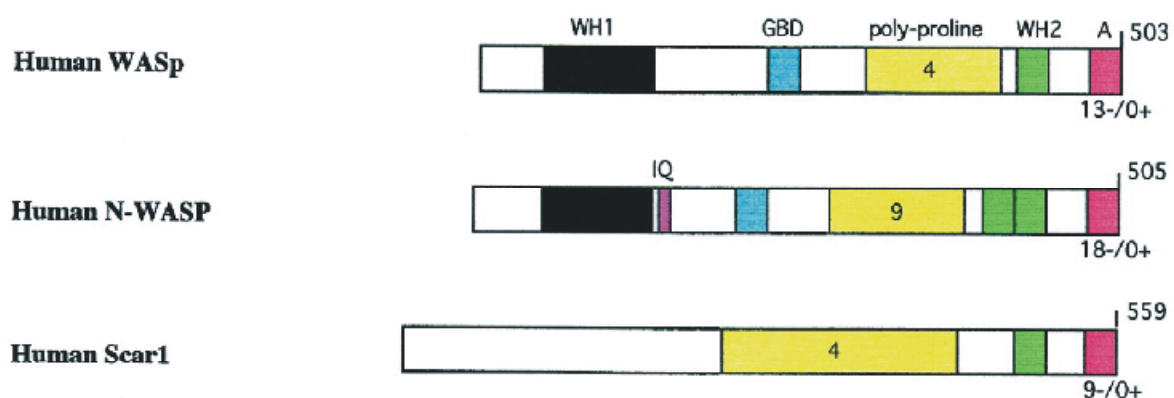
Aktivierter Arp2/3 Komplex ist sowohl für die Neu-Nukleation als auch die Nukleation von der Seite bereits bestehender Filamente von großer Bedeutung. Letzteres ist ein Prozess, der als "Branching" (= Verzweigen) bezeichnet wird. Dabei bindet Arp2/3 Komplex an die Seite bestehender Filamente und führt so zu einer Verzweigung der Filamente ("Dentritic Nucleation Model"; Blanchoin *et al.*, 2000a) (Abb.1.5.). Bindet Arp2/3 Komplex an Filamente, so führt dies zu einer weiteren Aktivierung des Moleküls (Higgs *et al.*, 1999; Pantaloni *et al.*, 2000). *In vivo* kommt es so zur Ausbildung eines komplexen Aktin-Netzwerkes, das eine sehr hohe mechanische Stabilität besitzt (Amann und Pollard, 2001) und so geeignet ist eine propulsive Kraft bei der Ausbildung von Pseudopodien auszuüben. Damit in Einklang steht die Beobachtung, dass Arp2/3 Komplex am "Leading Edge" der migrierenden Zelle lokalisiert ist (Machesky *et al.*, 1997). Die Proteine der WASp-Familie sind als Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes auch übergeordnete Regulatoren der zellulären Aktin Nukleation (Machesky *et al.*, 1999). Inzwischen sind aber auch Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes beschrieben, die nicht zu dieser Protein Familie gehören, so zum Beispiel Cortactin (Weed *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 2001). Durch die beschriebenen Regulationsmechanismen ist es der Zelle möglich die Aktin Nukleation schnell und zuverlässig an ihre wechselnden Bedürfnisse anzupassen. Coronin ist das erste beschriebene Protein, das Arp2/3 Komplex negativ regulieren kann (Humphries *et al.*, 2002).

In jüngster Zeit wurden aber auch Arp2/3 Komplex-unabhängige Wege der Aktin Nukleation entdeckt. Ein solcher Weg verläuft über die Proteine der Formin-Familie, die zuerst in Hefe beschrieben wurden (Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2001; Pruyne *et al.*, 2002; Evangelista *et al.*, 2003). Inzwischen sind auch in Eukaryoten Formine wie mDia1

beschrieben, die die Aktin Nukleation aktivieren können (Li und Higgs, 2003). Auch das Protein Zyxin kann in Säugerzellen solche Funktionen wahrnehmen (Fradelizi *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass die durch Arp2/3 Komplex oder Formine gebildeten Aktin-Strukturen unterschiedliche Funktionen in der Zelle wahrnehmen, was aber zur Zeit noch nicht experimentell gezeigt werden konnte (Zigmond, 2003).

#### 1.4.4. WASp/Scar-Familie Proteine

Die Hauptaufgabe der WASp-Familie Proteinen besteht darin, Signale auf das Zytoskelett zu übertragen (Mullins, 2000). Der zuerst beschriebene Vertreter dieser Protein Familie, WASp, ist ein Multidomänen-Protein von 502 Aminosäuren (Abb.1.7.). Es wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, gehört aber zu einer Familie von ubiquitär vorkommenden Protein (Übersicht bei Miki und Takenawa, 2003). Zu dieser Protein Familie gehören auch das zuerst in neuronalem Gewebe entdeckte N-WASP (Miki *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 1998), die drei Isoformen von WAVE/Scar (Suetsugu *et al.*, 1999) und das Hefeprotein Bee (Li, 1997) (Abb.1.7.). Viele Aminosäuremotive sind zwischen den einzelnen Homologen stark konserviert, während andere Domänen vor allem im N-Terminus proteinspezifisch sind (Übersicht bei Higgs und Pollard, 2001). Gemeinsam ist allen Proteinen der WASp/Scar-Familie eine Polyprolin Domäne, sowie eine WH2 Region und eine A Region (Abo, 1998). Den einzelnen Regionen können in der Zelle spezifische Funktionen zugeordnet werden.



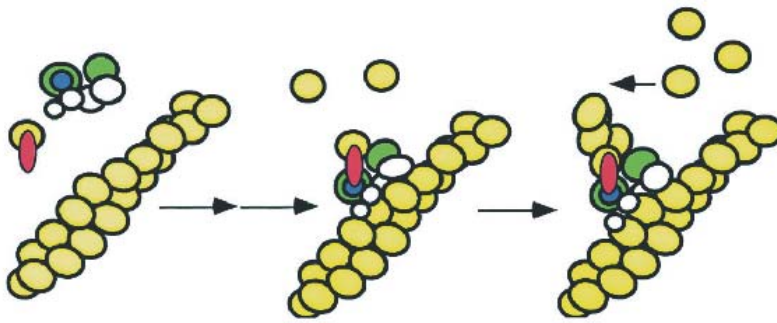
**Abb. 1.7. Domänenstruktur und Aminosäuremotive von WASp und seinen Homologen**

Schwarz: WH1 (WASP Homologie1) Domäne, blau: GBD (GTPasen-Bindungs Domäne), gelb: polyprolin Motiv (die Zahlen geben die Anzahl der Wiederholungen aus fünf oder mehr Prolinen an), grün: WH2 (WASP Homologie2), rot: A (Saure, "Acidic") Region (die Zahlen geben die Anzahl der sauren/basischen Aminosäuren an). Aus Higgs und Pollard, 1999.

Die Regulation von WASp erfolgt hauptsächlich über seinen N-terminalen Teil. Hier befinden sich Regionen, die mit verschiedenen Signalmolekülen interagieren können. Die WH1 Domäne (WASp Homologie1) bindet WIP (“WASp Interacting Protein”; Ramesh *et al.*, 1997). Ihr wird außerdem eine mögliche Rolle bei der Membranbindung von WASp zugesprochen (Miki *et al.*, 1996). Die Polyprolinreiche Domäne bindet Kinasen aus der Familie der TEC Proteine, Adapterproteinen wie Nck und Grb2 sowie Calmodulin und VASP (“Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein”; Übersicht bei Higgs und Pollard, 1999). Über die Src Kinasen gibt es widersprüchliche Berichte: *in vitro* scheinen sie mit der Polyprolin Domäne von WASp zu interagieren (Higgs und Pollard, 1999), *in vivo* wurde eine weiter N-terminal gelegene Region als Bindungsstelle beschrieben (Schulte und Sefton, 2003).

Zur schnellen und gerichteten Aktin Nukleation, und damit auch zur Ausbildung von Podosomen, Lamellen oder Filopodien, ist eine Aktivierung der WASp-Familie Proteine notwendig. In inaktiven Zustand liegt WASp in einer autoinhibitorischen Konformation vor (Überblick bei Higgs und Pollard, 2001). Dabei bindet die GBD Domäne an die C-terminale VCA Domäne (Kim *et al.*, 2000). Der Hauptmechanismus der Aktivierung verläuft bei WASp über eine Bindung von CDC42 an die GBD Domäne (Miki *et al.*, 1998; Takenawa und Miki, 2001) und gleichzeitig von PIP2 an die N-terminal davon gelegene Basische Region (Higgs und Pollard, 2000). Dies führt zur Aufhebung der autoinhibitorischen, rückgefalteten Konformation und zur Freilegung der aktiven Regionen (Kim *et al.*, 2000). Auch N-WASP wird über eine Autoinhibition reguliert (Miki *et al.*, 1998; Rohatgi *et al.*, 2000). WASp (Cory *et al.*, 2002) und N-WASP (Suetsugu *et al.*, 2002) werden darüber hinaus auch durch Phosphorylierung reguliert. Dabei kommt es durch Phosphat-Anheftung an ein Tyrosin in der Nähe der GBD Region zur Aufhebung der Autoinhibition. WAVE Proteine besitzen keine GBD Domäne und werden nicht über Autoinhibition reguliert (Miki *et al.*, 2000). Für die Isoform WAVE2 wurde gezeigt, dass sie durch die Signaltransduktions-Kaskade von Rac über IRSp53 zu WAVE aktiviert wird (Miki *et al.*, 2000).

Aktiviertes WASp kann mit seiner C-terminalen VCA Domäne die Aktin Nukleation aktivieren. Die V Region (“Verprolin-like“), auch WH2 (WASp Homologie2) genannt, bindet Aktin-Monomere (Miki und Takenawa, 1998), während die A Region (Saure, “Acidic“) für die Bindung von Arp2/3 Komplex verantwortlich ist (Machesky und Insall, 1998; diese Studien). Die C Region (“Central“ oder “Connecting“) ist sowohl an der Arp2/3 Komplex als auch der Aktin-Monomer Bindung beteiligt (Marchand *et al.*, 2001; diese Studien). Durch einen bislang unbekannten Schritt kommt es zu einer Aktivierung von Arp2/3 Komplex (Abb.1.8.).



**Abb.1.8. Funktion des Arp2/3 Komplexes bei der Verzweigung von Aktin-Filamenten**

Arp2/3 Komplex (grün/blau) bindet an die Seite bereits existierender Filamente (gelb). WASp/Scar (rot), welches ein Aktin-Monomer gebunden hat, bindet an Arp2/3 Komplex in einer bisher nicht gesicherten Reihenfolge. Der Komplex aus diesen drei Proteinen stellt den Nukleations-Kern für die Bildung eines neuen Filament Zweiges dar. Durch seitliche Bindung von Arp2/3 Komplex und WASp an ein bereits bestehendes Filament wird deren Interaktion verstärkt und die Ausbildung eines neuen Filaments begünstigt. Der dafür notwendige Aktivierungsschritt ist noch unbekannt (Marchand *et al.*, 2001). Aus Higgs und Pollard, 1999.

Ein Fehlen von Wiskott-Aldrich Syndrom Protein oder die Expression eines defekten Proteins kann zum Auftreten von Wiskott-Aldrich Syndrom führen (Derry *et al.*, 1995). Die damit assoziierten komplexen Immundefekte rühren alle von der Mutation in einem einzigen Gen her (Gen Bank Zugangsnummer: U12707).

## 1.5. Wiskott-Aldrich Syndrom entsteht durch Mutationen im WASp Gen

Das Wiskott-Aldrich Syndrom wurde erstmals 1937 als eine X-chromosomal rezessiv vererbte Immundefektkrankheit beschrieben (Wiskott, 1937; Aldrich *et al.*, 1954). Sie ist vornehmlich gekennzeichnet durch Immundefekte, Thrombozytopenie, Ekzeme und eine Lymphomneigung der meist noch sehr jungen männlichen Patienten (Nonoyama und Ochs, 1998; Ochs, 2002). Bis heute wurden viele verschiedene Mutationen im WASp Gen identifiziert. Es besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Mutation und Phänotyp, allerdings gehen Mutationen im N-Terminus meist mit einer milderen Verlaufsform als solche im C-Terminus einher. Punktmutationen in der WH1 Domäne führen so oftmals zur Expression eines Vollängen-Proteins, das Defekte in der Regulation aufweist. Der klinische Phänotyp wird als "X-linked Thrombozytopenia" bezeichnet (XLT; Zhu *et al.*, 1995). Allerdings sind auch bei dieser, im Vergleich zu WAS relativ harmlosen Erkrankung, neben den Thrombozyten weitere Zellen wie z.B. Makrophagen betroffen (Linder *et al.*, 2003). Mutationen in der GBD Region von WASp können durch eine Störung der Autoinhibition zu

einem konstitutiv aktiven, dysreguliertem Protein führen. Klinisch äußert sich dies in einer Neutropenie der betroffenen Patienten (Devriendt *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit der zentralen Rolle der VCA Domäne des WASp Moleküls wurde beschrieben, dass Kinder, die eine Mutation in dieser Region tragen oder ein C-terminal trunkiertes WASp Molekül exprimieren, an einer besonders schwerwiegenden Verlaufsform von WAS leiden (Zhu *et al.*, 1997).

Die Thrombozyten der betroffenen Knaben fallen durch ein zu kleines mittleres Volumen auf und werden vorzeitig in der Milz abgebaut (Krivit *et al.*, 1966). Allerdings können die Thrombozyten von WAS Patienten Arp2/3 Komplex noch aktivieren und das thrombozytäre Aktin-Zytoskelett ist funktionsfähig. Bei diesen Patienten wurde eine Aktivierung des Arp2/3 Komplexes durch WAVE festgestellt (Falet *et al.*, 2002).

Meist sind das zelluläre wie auch das humorale Immunsystem befallen. Rekurrende fieberhafte Infekte, vor allem des oberen und unteren Respirationstrakts, treten schon während der ersten sechs Lebensmonate gehäuft auf. Die Zahl der T-Lymphozyten nimmt während der ersten Lebensjahre durch Defekte in der Proliferation kontinuierlich ab (Molina, 1993). Die Funktion der T-Zellen ist meist beeinträchtigt. Morphologisch fällt auf, dass den Lymphozyten die unter physiologischen Bedingungen vorkommenden Mikrovilli an der Membranoberfläche fast vollständig fehlen, ein weiterer Hinweis auf ein gestörtes Zytoskelett (Kenney *et al.*, 1986). Allerdings gibt es neuere Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass auch Zellen von WAS Patienten Mikrovilli ausbilden können (Higgs, Manuskript in Vorbereitung). Es ist möglich, dass analog zu den Thrombozyten, Arp2/3 Komplex in diesen Zellen durch andere Proteine aktiviert wird.

Dendritische Zellen von WAS Patienten können nicht regelgerecht polarisieren und die Wanderung nach Stimulation mit einem chemoattraktiven Stoff erfolgt nicht zielgerichtet. Defekte der dendritischen Zellen der Haut (Binks *et al.*, 1998) werden heute für die Ekzeme, die oft schon während des ersten Lebensjahres auftreten, verantwortlich gemacht.

Sowohl Neutrophile als auch Makrophagen sind bei WAS Patienten in normaler Anzahl vorhanden. Die Polarisation und gerichtete Chemotaxis von Neutrophilen scheint intakt zu sein (Zicha *et al.*, 1998). Makrophagen weisen dagegen in dieser Hinsicht stark gestörte Eigenschaften auf (Badolato *et al.*, 1998). Da eine kontrollierte Aktin Nukleation und somit Propulsion von Lamellen in eine bestimmte Richtung nicht möglich ist, können die Makrophagen auch nicht gerichtet wandern. Das verstärkte Auftreten von Autoimmunerkrankungen (Sullivan *et al.*, 1994), Lymphomen, sowie anderer bösartiger Erkrankungen weist auf die Bedeutung einer intakten Makrophagen-Funktion bei der

Bekämpfung dieser körpereigenen Erkrankungen hin. Eine Transfektion der WAS Makrophagen mit WASp DNA führt zur Restitution der Zellmorphologie und einer normalen Makrophagen-Funktion (Jones *et al.*, 2002).

## 1.6. Aufgabenstellung

Ziel der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente war es erstens, den molekularen Mechanismus der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein- (WASp-) abhängigen, Arp2/3 Komplex-vermittelten, Aktin Nukleation *in vitro* und in humanen Makrophagen weiter aufzuklären. Darüber hinaus sollte die Rolle von Mikrotubuli und WASp bei der Aktin Nukleation in spezialisierten Adhäsionsstrukturen von Makrophagen, den Podosomen, genauer untersucht werden.

1. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass die C-terminale Region von WASp die Ausbildung von Aktin-Filamenten durch Arp2/3 Komplex initiieren kann (Machesky und Insall, 1998). Es war aber nur sehr unzureichend charakterisiert, welche Regionen von WASp für die Arp2/3 Komplex Aktivierung essentiell sind. Ziel dieser Studien war es deshalb, die für die Aktin Nukleations-Aktivierung minimal notwendigen Regionen von WASp *in vitro* und in humanen Makrophagen zu identifizieren. Während wir die Funktionen der verschiedenen WASp Regionen untersuchten, verdichteten sich die Hinweise aus unserer eigenen und anderen Arbeitsgruppen (Marchand *et al.*, 2001), dass der Aktin Nukleations-Aktivator Arp2/3 Komplex nicht nur in einer aktiven und einer inaktiven Konformation vorliegen kann, sondern dass er über verschiedene Zwischenschritte aktiviert wird. Wir wollten deshalb in dieser Arbeit Hinweise für den Mechanismus der Arp2/3 Komplex Aktivierung gewinnen.
2. In unserer Arbeitsgruppe waren die Podosomen, aktinreiche Adhäsionsstrukturen von primären humanen Makrophagen, als erste Strukturen in Makrophagen identifiziert worden, in denen WASp lokalisiert ist und die durch WASp reguliert werden (Linder *et al.*, 1999). Da weiterhin Studien vorlagen, die einen Einfluss von Mikrotubuli auf die Podosomen Lokalisation in Osteoklasten beschrieben (Babb *et al.*, 1997), sollte der mögliche Einfluss von Mikrotubuli bei der WASp-abhängigen Aktin Nukleation in Podosomen näher erforscht werden.



**Though this be madness, yet there is method in' t**

William Shakespeare (1564-1616)

englischer Dichter, Dramatiker, Schauspieler und Theaterleiter (aus: Hamlet, II,2)

## **2. MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial**

Alle aufgeführten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, von folgenden Firmen geliefert:

Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)  
Boehringer (Mannheim, Deutschland)  
Dianova (Hamburg, Deutschland)  
Difco (Augsburg, Deutschland)  
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Gibco (Eggenstein, Deutschland)  
Merck (Darmstadt, Deutschland)  
Nunc (Wiesbaden, Deutschland)  
Pharmacia (Freiburg, Deutschland)  
Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)  
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)  
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Folgende Kit-Systeme wurden nach den Gebrauchsanweisungen der Hersteller verwendet:

“DNS Gel Extraktion-Kit“:	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
“His-Tag Purification-Kit“:	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
“MiniMACS CD14 Microbeads“:	Miltenvi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
“PCR Purification-Kit“:	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
“Plasmid-Midipräp-Kit“:	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
“Plasmid-Minipräp-Kit“:	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
“Super Signal Chemolumineszenz-Kit“:	Pierce, Rockford, USA

Die Bezugsquelle von Antikörpern und Enzymen, sowie von Substanzen, wo diese wichtig erscheint, ist an der entsprechenden Stelle angegeben.

### **2.2. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1. Allgemeines**

Für die Kultur von *Escherichia coli* wurden alle Medien mit deionisiertem und gefiltertem (Millipore-Ionenaustauscher) Wasser zubereitet. Nach Zugabe der Komponenten wurden die

Medien bei 120°C, 1.5 bar, 45 min autoklaviert. Hitzelabile Substanzen, wie Glucose oder Antibiotika, wurden steril filtriert und nach Abkühlen der autoklavierten Medien auf ca. 50°C zugegeben. Plastikgefäße wurden steril vom Hersteller bezogen, Glasgefäße vor dem Gebrauch durch autoklavieren sterilisiert.

Die Kultur primärer humaner Makrophagen erfolgte in sterilem, endotoxinfreien RPMI Medium, dem 20% autologes, steril filtriertes Serum, sowie Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) beigegeben wurden. Die Kultur erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit. Alle Zellkulturgefäße waren aus Plastik und wurden vom Hersteller steril und endotoxinfrei bezogen.

### 2.2.2. *Escherichia coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte nach Standard Methoden (Sambrook *et al.*, 1989) mit SOB-Nährmedium in Flüssigkultur (200 rpm) oder auf Agarplatten. Die Temperatur bei Anzucht betrug in der Regel 37°C, nur bei der Expression bestimmter Proteine wurde die Temperatur auf 20°C erniedrigt, dies ist an entsprechender Stelle vermerkt. Die Selektion resistenter Stämme erfolgte je nach Resistenzplasmid durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 25 µg/ml).

Zur längerfristigen Konservierung oder Sicherung von Klonen wurden Bakterien über Nacht in 100 ml Medium unter Selektionsbedingungen angezogenen. 0.5 ml der Kultur wurden mit 0.5 ml SOB/Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und in einem Eppendorfgefäß bei –80°C gelagert.

#### **SOB-Flüssigmedium**

Fertigmix wurde laut Herstellerangabe in H<sub>2</sub>O dest. gelöst

#### **SOC-Flüssigmedium**

SOB mit  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Glucose

#### **SOB/Glycerin**

SOB mit 40vol% Glycerin

#### **SOB Agarplatten**

Fertigmix wurde laut Herstellerangabe in H<sub>2</sub>O dest. gelöst  
25 ml pro 100 mm Platte gegossen

### 2.2.3. Präparation primärer humaner Monozyten

Aus 150-250 ml venösem Blut eines freiwilligen Spenders wurden durch Zentrifugation des heperanisierten Blutes in einem Ficollgradienten (Biochrom, Berlin, Deutschland) primäre humane Leukozyten gewonnen. Dieser Schritt erfolgte in sterilen, konischen 50 ml Gefäßen in einer Heraeus Sepatec Omnifuge 2.ORS (Heraeus, Osterode, Deutschland) bei 1500 rpm, 30 min, 5°C unter Ausschaltung der Bremse, um den Gradienten nicht zu stören. Die Schicht, die die Leukozyten enthält, wurde abgenommen und die Zellen mehrmals in kaltem RPMI gewaschen (1500 rpm, 10 min, 5°C). Dabei wurden die Zellen in ein 1.5 ml Eppendorfcups überführt. Nach ungefähr drei Waschschritten wurden die Zellen in 400 µl Monopuffer resuspendiert und zusammen mit 100 µl magnetischen anti-CD14 “Beads“ (=Kügelchen) (siehe Kitsysteme 2.1.) für 15 min auf Eis inkubiert. Die Säule für die Isolation wurde nach Herstellerangaben im Magneten befestigt, mit 500 µl kaltem Monopuffer gespült und die mit “Beads“ vorinkubierten Zellen darüber gegeben. Das maximale Fassungsvermögen der Säule beträgt ca. 50 Millionen Zellen. Die Säule wurde 3x mit kaltem Monopuffer gewaschen, aus dem Magneten genommen, und die gebundenen mononukleären Zellen nachfolgend mit 1 ml Monopuffer eluiert. Die so gewonnenen Zellen wurden bei 1500 rpm, 10 min, 5°C abzentrifugiert und in eiskaltem RPMI resuspendiert. Sie wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Für Mikroskopie, Injektionen oder Adhäsionsexperimente wurden die Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  pro sterilen Cellocate Deckgläschen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ausgesät. Die Deckgläschen wurden für die Zellkultur in “8-Wellplatten“ (Platten mit acht Vertiefungen) gelegt. Für biochemische Analysen wurden die Monozyten in “6-Wellplatten“ mit einer Dichte von 1 Million pro “Well“ ausgesät. Nach Anheften der Zellen (ca. 2 h später) wurde pro “8-Wellplatte“ 1.5 pro “6-Wellplatte“ 2 ml Medium mit Antibiotikum und 20% Serum beigegeben. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Zellen wurden fünf bis sieben Tage später, nach Ausdifferenzierung zu Makrophagen, für Versuche verwandt.

#### Monopuffer für Säule

5 mM EDTA pH 7.4  
0.5% humanes Albumin  
in PBS  
steril filtrieren

#### 2.2.4. WAS Makrophagen

Makrophagen von Patienten wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll isoliert, wobei meist zwischen 20-100 ml Spenderblut als Ausgangsmaterial dienten. Die Patienten oder ihre Eltern wurden ausführlich über die Verwendung des Blutes aufgeklärt, und die Blutabnahme erfolgte nach ausdrücklicher Einwilligung der Patienten oder ihrer Eltern. Der Patient dessen Zellen in dieser Arbeit verwendet wurden hatte folgende identifizierte Mutation: Pat. 3,603 (Schindelhauer *et al.*, 1996): Mutation C995T, die zu einem vorzeitigen Stopkodon führt. Bei dem Patienten konnte kein WASp Protein Signal oder WASp mRNA Signal im Western bzw. Northern Blot detektiert werden. Dies scheint dadurch bedingt, dass die mutierte mRNA sehr instabil war, was zu einer scheinbaren Nullmutation führte.

#### 2.2.5. Adhäsionsversuche

Monozyten wurden von der Separationssäule eluiert (s.o.) und einmal in kaltem RPMI gewaschen (1500 rpm, 10 min, 5°C, Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Ein Aliquot der frisch isolierten Zellen wurde entweder mit Nocodazol (1 µM in DMSO), Benomyl (100 µM in DMSO) oder Vinblastin (1 µM in DMSO) (alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland) oder mit DMSO alleine als Kontrolle versetzt. Danach wurden die Monozyten mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen adhärten für die jeweils angegebenen Zeiten. In einigen Versuchen wurden die zugegebenen Substanzen wieder ausgewaschen. Dazu wurden die Deckgläschen zuerst 2x 5 min in frischem, angewärmten RPMI gewaschen und dann noch einmal 2 h in frischem RPMI bei 37°C inkubiert. Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden, verhielten sich wie unbehandelte Kontrollzellen.

#### 2.2.6. Versuche zur Podosomen-Deassemblierung

Makrophagen wurden für fünf bis sieben Tage auf Deckgläschen angezogen. Für den Versuch wurden sie in "24-Wellplatten" überführt, die jeweils 1 ml RPMI enthielten. Dieses wurde mit 2 µM Cytochalasin D oder 25 µM des Tyrosinkinase-Inhibitor PP2 (beide Sigma, Deisenhofen, Deutschland) supplementiert und die Zellen darin für 1 h inkubiert. Die Zellen

wurden entweder direkt fixiert oder die zuvor zugegebenen Substanzen wieder ausgewaschen. Dazu wurden die Deckgläschen 2x 5 min in frischem PRMI gewaschen und dann für die angegebenen Zeiten in frischem RPMI inkubiert. Dem Auswaschmedium wurde, wenn angegeben, 1  $\mu$ M Nocodazol und/oder 1 mM RGDS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) beigegeben.

### 2.2.7. Stimulierungsversuche

Makrophagen wurden für fünf bis sieben Tage auf Deckgläschen kultiviert. Für Stimulierungsversuche wurden zwei unterschiedliche Ansätze benützt, die aber zu gleichen Ergebnissen führten. Die Deckgläschen mit Makrophagen wurden in ein "Well" einer "8-Wellplatte" mit 2 ml Medium gelegt. Auf die gegenüberliegende Seite des "Wells" wurde ein Stück aus 200  $\mu$ l 2% Agarose mit 100  $\mu$ g/ml fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gegeben, die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten fixiert. In einem anderen Ansatz wurden die Deckgläschen in ein "Well" einer "12-Wellplatte" gelegt und 1 ml Medium zugegeben. Direkt ins Medium wurde fMLP in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ $\mu$ l gegeben.

### 2.2.8. Gewinnung und Kultur primärer humaner Endothelzellen

"Human Endothelial Vein Cells" (HUVEC) wurden aus frischen Nabelschnüren unter sterilen Bedingungen isoliert und in Zellkulturflaschen ausgesät (Aepfelbacher *et al.*, 1997). Diese waren am Tag zuvor mit 2.5% Kollagen (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) beschichtet und bei 37°C getrocknet worden. HUVECs wurden in Endothelzellmedium mit Supplement kultiviert. Zum Teilen der Zellen wurden diese mit Trypsin/EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (ca. 1 min) abgelöst, bei 800 rpm, 5 min, 37°C abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) und in frischem Medium resuspendiert. Für Versuche wurden die Zellen bis zur p2-p4 Generation gezüchtet, mit einer Dichte von ca.  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  auf Glass- oder Plastikdeckscheiben ausgesät und für ca. 10 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Wachstumsbedingungen und Mediumwechsel entsprachen den für Makrophagen beschriebenen.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Agarose-Gel Elektrophorese und DNS Isolation

Die 2D Elektrophorese von DNA wurde nach etablierter Methodik durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). 1gew% "low-melt" (schmilzt schon bei niedriger Temperatur) Agarose (Biorad, München, Deutschland) wurde in der Mikrowelle in 1x TBE gelöst. Nach dem Abkühlen wurden zu je 100 ml Agaroselösung 3 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNS und macht sie so bei Anregung mit 312 nm sichtbar. Die zu analysierenden DNS Lösungen wurden mit 1/5 Volumen 6xLadepuffer ("Loading Dye") versetzt und bei 50-150 V aufgetrennt. Die Konzentration der DNS wurde anhand einer Probe mit bekannter Konzentration abgeschätzt. Nach Auftrennung wurden die DNS-Banden mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera (Polaroid, Cambridge, USA, Film Typ 667) dokumentiert.

Die Aufreinigung erfolgte durch Ausschneiden der DNS-Bande mit einem sterilen Skalpell unter der UV-Lampe und Extraktion der DNS aus der Agarose mittels Quiagen "Gel Extraction-Kit" (siehe Kits 2.1.). Die DNS wurde nach der Aufreinigung mit 50 µl destilliertem, sterilem H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 20xTBE-Puffer

TRIS/HCl pH 8	1.78 M
Borsäure	1.78 M
EDTA pH 8	40 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

#### "Loading Dye"

Bromphenolblau	0.25vol%
Xylencyanol	0.25vol%
Glycerin	30vol%
H <sub>2</sub> O dest.	

### 2.3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR wurde mit den angegebenen "Primern" in einem PCR-Cycler (Uno-Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Da kein Heizdeckel verwendet wurde, wurden die Proben jeweils mit einem Tropfen sterilen Mineralöl abgedichtet. Die PCR wurde in "hot-start" Technik durchgeführt, d.h. die DNS-Polymerase (Goldstar, Eurogentec, Seraing, Belgien oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) wurde erst nach dem ersten, längeren Denaturierungsschritt zugegeben.

**PCR Standardmix**

DNS-Template	100 ng
MgCl <sub>2</sub>	variabel 1-10 nM
dNTP-Mix	je 10 mM
“Primer“1	50 pM
“Primer“2	50 pM
Reaktionspuffer ohne MgCl <sub>2</sub>	1x
Taq-Polymerase	1 U pro Ansatz
dest. und steril. H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Standardprotokoll PCR**

1. Denaturierung 95°C 5 min
  2. Denaturierung 95°C 1 min
  3. “Primer“ binden 40-60°C 1 min
  4. Elongation 72°C 1 min  
(für 2000 Bp, sonst länger)
- 2.-4. 30 Zyklen
5. Schlussexension 72°C 10 min

Die MgCl<sub>2</sub> Konzentration sowie die Temperatur für das Binden der “Primer“ (“Annealing“) wurden für die jeweiligen Konstrukt modifiziert. Meist wurden Ansätze mit 1, 5 und 10 µM MgCl<sub>2</sub> gemacht. Höhere MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen verminderten die Anzahl unspezifischer Bindungen. Die Standard Annealingtemperatur betrug 55°C. Je niedriger die Annealingtemperatur gewählt wurde, umso mehr unspezifische Bindungen konnten auftreten. Zur weiteren Verwendung wurde die DNS mittels Quiagen “PCR Purification-Kit“ (siehe Kits 2.1.) gereinigt und weiter eingesetzt.

**2.3.3. Restriktionsverdau der DNS**

Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller gelieferten Verdaupuffern eingesetzt. Die Verdau wurden in einem Volumen von 20-100 µl durchgeführt.

**Standardprotokoll DNS Verdau**

DNS	100-500 ng
Restriktionsenzym1	10 U
Restriktionsenzym2	10 U
Reaktionspuffer	1x
H <sub>2</sub> O	ad 20-100µl
(je nach Ausgangskonzentration der DNS)	



EcoRI (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

BamHI (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

Da sich Glycerin ab einer Konzentration von mehr als 5vol% störend auf die Enzymaktivität auswirken kann, wurde darauf geachtet die Konzentration der Restriktionsenzyme, die sich in 50vol% Glycerin befanden, entsprechend gering zu halten. Ansätze wurden für 1-2 h bei 37°C inkubiert und die Enzyme bei 65°C inaktiviert. Die verdaute DNS wurde auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und gereinigt, wie unter 2.3.1. beschrieben.

#### **2.3.4. Ligation der Konstrukte in Vektoren**

Von der geextrahierten DNS wurde ein Aliquot, meist 5 µl, auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Anhand eines mit aufgetrennten Standards zur Größen- und Konzentrations-Abschätzung wurde die Konzentration approximiert. Auch der Vektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurde vor der Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und über ein Gel gereinigt.

##### **Standardansatz Ligation (auf Eis pipettieren)**

Vektor	50 ng
Insert-DNS	in der selben molarer Menge
Ligasepuffer	1x
Ligase	5 U
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und die DNS am nächsten Tag ausgefällt und aufgereinigt. Dazu wurde der Ligationsansatz mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und 2.5 Volumen 98% EtOH und 1/10 Volumen 5 M NaCl<sub>2</sub> zugegeben. Die DNS wurde durch Zentrifugation bei 13000 U 4°C pelletiert (Ultrazentrifuge, Optima, TLX-120, Beckman, Rotor TLA1004) und in 1 ml 75% EtOH gewaschen, um Salzurückstände aus dem Pellet zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation unter den obengenannten Bedingungen für 5 min wurde die DNS solange in der Vakkumzentrifuge (Univapo 150 H, Krampa, Martinsried, Deutschland) getrocknet, bis alle Flüssigkeit vollständig verdampft war. Sie wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und war nun für die Transformation vorbereitet.

### 2.3.5. Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation

Kompetente Zellen wurden von den Stämmen DH5 $\alpha$  oder BL21DE3 (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) in nachfolgend beschriebener Weise hergestellt, wobei es für die Effizienz der Transformation von Bedeutung war, dass alle Schritte strikt auf Eis und mit eiskalten Reagenzien durchgeführt wurden: 1 l SOB wurde mit 10 ml einer über-Nacht Bakterienkultur beimpft, und die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 (entspricht ca. 3 h Wachstum) bei 37°C wachsen gelassen. Sie wurden in einem Kontron Bioteck/Hermele Centricon H-401, Rotor A6.9 bei 4000 rpm, 10 min, 4°C geerntet. Die Bakterien wurden dann in 1 l und nachfolgend in 0.5 l eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 20 ml H<sub>2</sub>O/10vol% Glycerin resuspendiert, noch einmal 15 min pelletiert und zum Lagern in 2 ml H<sub>2</sub>O/10vol% Glycerin aufgenommen (entspricht ca.  $3 \times 10^{10}$  Zellen/ml). Die kompetenten Zellen wurden in 100  $\mu$ l Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 50  $\mu$ l auf Eis aufgetaute Zellsuspension zusammen mit 5  $\mu$ l ligierter DNS in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationskuvette gegeben. Der Ansatz wurde in einem GenePulser (Biorad, München, Deutschland) bei 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 2.5 kV transformiert. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Transformation mit kaltem SOC versetzt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. 100  $\mu$ l wurden auf einer mit Antibiotikum versetzten, angewärmten SOB-Agarplatte ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden 1 min bei 6000 U, RT pelletiert (Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde bis auf ca. 100  $\mu$ l abgenommen und die Zellen in diesem Rest resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### SOC-Flüssigmedium

SOB mit	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

### 2.3.6. Direkte PCR zur Identifikation positiver Klone

Klone, die über Nacht gewachsen waren, wurden als potentiell positiv angesehen und mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Sie wurden als kleiner Strich auf einer SOB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (“gesichert”). Anschließend wurden noch an

der Pipettenspitze anhaftende Bakterien durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren sowie Drehen der Pipette in einen vorher zusammen pipettiertem PCR-Ansatz gegeben.  $\text{MgCl}_2$  Konzentrationen und Annealingtemperatur wurden entsprechend den bei der ursprünglichen Herstellung des Konstrukts empirisch ermittelten Werten gewählt. Die Temperatur für den ersten Denaturierungsschritt betrug, anders als im Standardprotokoll angegeben,  $99^\circ\text{C}$ .

### **2.3.7. Isolierung der Plasmide aus *E. coli* und Sequenzierung**

Je nach gewünschter DNS Menge wurden 5 oder 100 ml SOB/Antibiotikumlösung mit einer Pipettenspitze Bakterien des entsprechenden Klons beimpft. Die Bakterien wurden am nächsten Morgen bei 6000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$  (Kontron Biotek/Hermele Centricon H-401 Rotor A6) pelletiert und die DNS entsprechend mit einem “Mini-Kit“ von Quiagen oder einem “Plasmid-Midiprep-Kit“ (siehe Kits 2.1.) extrahiert.

Für die Sequenzierung wurde die DNS durch Ausfällen konzentriert. Dazu wurden die DNS mit 0.7 Volumen Isopropanol ausgefällt, bei 13000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min (Ultrazentrifuge, Optima, TLX-120, Beckman, Rotor TLA1004) zentrifugiert, und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet. Die DNS wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, bei Präparation von 100 ml Bakterien meist in 100  $\mu\text{l}$ . Zur Konzentrationsabschätzung wurde ein Aliquot auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Für die Sequenzierung wurden 2  $\mu\text{g}$  von einer Mindestkonzentration von 100 ng/ $\mu\text{l}$  an MWG (Martinsried, Deutschland) verschickt.

### **2.3.8. Einführung von Restriktionsstellen in DNS**

Zur Klonierung von DNS in einen Vektor wurden 5' und 3' des interessierenden DNS Bereichs Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt. Dazu wurden “Primer“ synthetisiert, die die jeweils komplementäre Sequenz für die Schnittstelle enthielten, 5' sowie 3' davon aber exakt mit dem jeweilig komplementären Strang hybridisieren konnten. Um eine effiziente Synthese durch die Polymerase zu erreichen, wurde darauf geachtet, dass die 3' Enden der Oligonukleotide eine feste Bindung mit der Ziel DNS aufwiesen. Dies wurde erreicht, indem die “Primer“ wo immer möglich mit mehrer Cytosin- oder Guanin-

Nukleotiden endeten. Weiterhin wurde geprüft, dass die jeweiligen eingeführten Schnittmotive nicht noch an anderer Stelle im klonierten Bereich vorkamen.

### **2.3.9. “Primer“ der verschiedenen WASp Konstrukte**

Zuerst ist stets der 5′ als zweites der 3′ “Primer“ angegeben. Alle “Primer“ sind in 5′ 3′ Richtung aufgeführt.

Die WASp Original-DNA wurde von ATCC (Rockville, USA) bezogen.

#### **Mutierte und trunkierte Konstrukte der WASp/N-WASP/WAVE-Sauren (A) Regionen:**

##### **A Konstrukt (30/19) AS 488-502**

Zum Vergleich: WASp C-Terminus Proteinsequenz HSSDEGEDQAGDEDEDDEWDD

BamH1 EcoR1

5′ MW 30 CTCCTCCGACGGATCCGAGGACCAGGC

3′ MW 19 CACAGGGCAGCAAGGATTTCTAGCCACTCAG

##### **A13 Konstrukt (31/29) AS 485-502**

BamH1 EcoR1

5′ MW 31 GACGAAGGGGATCCAGGCTGGCG

3′ MW 29 GTGGGCACAGAGAATTCTGGAGGGGGAGCC

##### **A11 Konstrukt (33/29) AS 483-502**

BamH1 EcoR1

5′ MW 33 GAAGGGGAGGACGGATCCGGCCATGAAGATG

3′ MW 29 GTGGGCACAGAGAATTCTGGAGGGGGAGCC

##### **A9 Konstrukt (34/29) AS 481-502**

BamH1 EcoR1

5′ MW 34 GGACCAGGCTGGATCCGAAGATGAAGATG

3′ MW 29 GTGGGCACAGAGAATTCTGGAGGGGGAGCC

##### **A7 Konstrukt (35/29) AS 479-502**

BamH1 EcoR1

5' MW 35 GGCTGGCGATGGATCCGAAGATGATGAA  
3' MW 29 GTGGGCACAGAGAATTCGGAGGGGGAGCC

**W500S (MA 3/MA 4) AS 488-502**

Zum Vergleich: WASp C-Terminus mit Mutation HSSDEGEDQAGDEDEDDESDD

BamH1 EcoR1

5' MA 3 GATCCGAGGACCAGGCTGGCGATGAAGATGAAGATGATGAATCGGATG  
ACTGAG  
3' MA 4 AATTCTCAGTCATCCGATTCATCATCTTCATCTTCATCGCCAGCCTGGTCC  
TCG

**WAVE C-Terminus (WAVE 1/2)**

Zum Vergleich: WAVE C-Terminus Proteinsequenz EVSDSEDDSEFDEVDWLE

BamH1 EcoR1

5' WAVE 1 GATCCGATTCGGAAGATGATTCAGAATTTGATGAAGTAGATTGGTTG  
GAGG  
3' WAVE 2 AATTCCTCCAACCAATCTACTTCATCAAATTCTGAATCATCTTCCGAA  
TCG

**N-WASP C-Terminus (N-WASP 1/2)**

Zum Vergleich N-WASP C-Terminus Proteinsequenz HSSDEDEDEDDEEDFEDDDDEWED

BamH1 EcoR1

5' N-WASP 1 GATCCGAAGATGAAGATGATGAAGAAGATTTTGAGGATGATGATG  
ATGGGGAAGACG  
3' N-WASP 2 AATTCGTCTTCCCACATCAGCATCCTCAAAATCTTCTTCATCATCT  
TCATCTTCG

**Konstrukte weiterer WASp Regionen:****Polyprolin Konstrukt (5/6) AS 311-404**

BamH1 EcoR1

5' MW 5 GCGGCAGGAGATGGGATCCCAGGAGCCACTTCC  
3' MW 6 GTGGGGGSGGGGCGAATTCATTCCCGGAGCTGGG

**VCA Konstrukt (11/8) AS 425-502**

BamH1 BamH1

5' MW 11 CTGGTGCCGGATCCCTGGCCCCCTGGTGG

3' MW 8 CACAGGGCAGCAAGGGATCCAGCCACTCAG

**VC Konstrukt (11/12) AS 425-489**

BamH1 BamH1

5' MW 11 CTGGTGCCGGATCCCTGGCCCCCTGGTGG

3' MW 12 CTTTCATCGCCAGCCGGATCCTCCCCCTTCGTC

**CA Konstrukt (15/19) AS 455-502**

BAMH1 ECOR1

5' MW 15 GGGGCCCCAGAGGGATCCGCGCTGCAGCCACC

3' MW 19 CACAGGGCAGCAAGGATTTTCAGCCACTCAG

**V Konstrukt (13/14) AS 425-453**

BamH1 BamH1

5' MW 13 GCCTGGCCCCCTGGATCCGGTCGGGGAGCGC

3' MW 14 GAGGTGGTGGCTGGGATCCTGAGCTCTCTGGGGC

**C Konstrukt (15/16) AS 455-489**

BamH1 EcoR1

5' MW 15 GGGGCCCCAGAGGGATCCGCGCTGCAGCCACC

3' MW 16 CTTTCATCGCCAGCCGAATTCTCCCCCTTCGTC

Bei den N-WASP-A und WAVE-A Konstrukten, sowie dem WASp-A/W500S Konstrukt, wurden synthetisch hergestellte Oligonuklide direkt in den Vektor ligiert.

**2.3.10. Nicht selbst hergestellte Konstrukte**

CIP Konstrukte (Tian *et al.*, 2000) waren ein freundliches Geschenk von Dr. D.M. Steward NIH, Bethesda, USA. Beide Konstrukte (AS 1-481 und AS 118-545) waren GST-fusioniert. Das Dynamin II-Polyprolin Konstrukt (Dong *et al.*, unpubliziert) war ein Geschenk von Dr. P.

Westermann, Max Delbrück Zentrum, Berlin, Deutschland. Bei dem Konstrukt handelte es sich um AS 741-870, His und S verknüpft, in Vector pET30a (+). Vektoren für die Expression von V12CDC42HS und V12Rac1 wurden freundlicherweise von Dr. A. Hall, London, England zur Verfügung gestellt. Beide Konstrukte waren GST-fusioniert.

## 2.4. Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)

Proteingemische wurden durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (Garfin, 1990; nach Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden je nach Proteingröße 10-15% Acrylamid-Gele von 1 mm Dicke hergestellt. Herstellung und Lauf der Gele erfolgte mit einem Minigel System von Biorad (München, Deutschland). Die Proben wurden mit 1 Volumen 2xProbenpuffer versetzt, 5 min bei 100°C erhitzt und geschüttelt, und zusammen mit 5-10 µl vorgefärbtem "Low" oder "High Molecular Weight Marker" in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgt bei 100 mV. Zur direkten Darstellung der Proteinbanden wurden die Gele nach abgeschlossenen Lauf für ca. 30 min in Coomassie-Lösung inkubiert (Weber *et al.*, 1972), kurz gewaschen und anschließend bis zur klaren Darstellung der Banden in Entfärbelösung inkubiert.

#### Trenngelpuffer

TRIS/HCl pH 8.8	1.5 M
SDS	0.4 g
H <sub>2</sub> O dest.	

#### Sammelgelpuffer

TRIS/HCl pH 6.8	0.5 M
SDS	0.4 g
H <sub>2</sub> O dest.	

#### 10xLaufpuffer

TRIS/HCl pH 8.6	25 mM
SDS	0.1%
Glycin	192 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

#### 5xProbenpuffer

TRIS/HCl pH 6.8	150 mM
SDS	10gew%
β-Mercaptoethanol	12.5vol%
Glycerin	25vol%
Bromphenolblau	0.1vol%
EDTA	2.5 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

**Entfärbelösung**

Essigsäure	10vol%
Methanol	30vol%
H <sub>2</sub> O dest.	

**Färbelösung**

“Coomassie Blue“	0.1gew%
Essigsäure	10vol%
Methanol	30vol%
H <sub>2</sub> O dest.	

**APS-Lösung**

APS	10gew%
H <sub>2</sub> O dest.	

Statt TRIS/HCl kann auch TRIS-Base verwandt werden, auf das Einstellen des pH kann dann verzichtet werden.

**Zusammensetzung eines 10% SDS-Polyacrylamid-Gels**

	Sammelgel	Trenngel
Sammel/Trenngelpuffer	0.63 ml	1.25 ml
Acrylamid	0.33 ml	1.7 ml
H <sub>2</sub> Odest	1.55 ml	2.1 ml
APS Lösung	12.5 µl	25 µl
TEMED	2.5 µl	2.5 µl

**2.4.2. Nachweis von Proteinen mit Immunoblot (Western Blot)**

Proteingemische wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend nach Towbin *et al.*, (1979) mittels eines Nassblottsystems (Biorad, München, Germany) auf eine PVDF Membran (Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dieser Blottvorgang fand für 1 h bei 4°C und 80 V unter ständigem Rühren statt. Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Kammer genommen und die Seite, auf der sich die Proteine befanden, markiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation für 1 h bei RT in TBST mit 2% BSA und 5% Magermilchpulver geblockt. Die Membran wurde 3x in TBST gewaschen (je 5 min), bevor für 45 min mit dem ersten Antikörper inkubiert wurde. Drauf folgten 3 erneute Waschschrte in TBST. Der 2. Antikörper, gegen die schwere Kette des ersten gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt, wurde für 45 min zugegeben (Dianova, Hamburg, Deutschland). Der Blot wurde nochmals 3x 5 min gewaschen. Durch Inkubation mit den Lösungen des Chemolumineszenz-Kits (siehe 2.1. Kitsysteme) wurden Signale sichtbar gemacht und auf Kodak X-OMAT AR Filmen meist durch Expositionszeiten zwischen 0.5-15 min dokumentiert. Durch



anschließende Inkubation mit “Stripping-Buffer“ (60°C, 10 min) wurden die Antikörper vom Blot entfernt, so dass dieser bei Bedarf mit einem neuen Antikörper inkubiert werden konnte.

**10xBlot-Transferpuffer**

TRIS/HCl pH 6.8	25 mM
Glycin	96 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

**TBST**

TRIS/HCl pH 7.4	2 mM
NaCl <sub>2</sub>	15 mM
Tween20	0.3vol%
H <sub>2</sub> O dest.	

**“Stripping-Buffer” 100 ml**

TRIS pH 7.4	6 ml
SDS	2 g
β-Mercaptoethanol	800 µl
H <sub>2</sub> O dest.	

**2.4.3. Bestimmung von Proteinmengen**

Die Bestimmung erfolgte nach unterschiedlichen Methoden, unter anderem mit Bradford Reagenz (Bradford, 1976). Die Lösung wurde gemäss Herstellerangaben eingesetzt. Dabei erfolgte die Abschätzung von Proteinkonzentrationen durch Vergleich mit Proben bekannter Proteinkonzentration. Bei Proteinen, die genügend aromatische Aminosäuren enthielten, wurde eine Abschätzung der Proteinkonzentration im Photometer durchgeführt. Dazu wurde zuerst mit entsprechendem Puffer equilibriert. Dann wurde die OD<sub>280</sub> der Probe bestimmt. Die Proteinkonzentration errechnet sich ungefähr nach der Beziehung  $0.5 \times \text{OD}_{280} = X \text{ mg/ml Protein}$ .

**2.4.4. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *Escherichia coli***

GST-Fusionsproteine wurden wie beschrieben exprimiert (Ridley und Hall, 1992) und aufgereinigt. Dazu wurden 100 ml SOB mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit transformierten *Escherichia coli* Kulturen beimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 10 ml dieser Kultur 1:100 in Fernbachkolben, die 1 l SOB mit Antibiotikum enthielten, verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 angezüchtet. Nach ca. 3 h wurden mit 1 mM IPTG induziert und nochmals 3 h geschüttelt. Bei dem WASp-Polyprolin Konstrukt wurden abweichend hiervon die zu exprimierenden

Kolonien direkt in die Fernbachkolben mit 1 l SOB mit Antibiotikum gegeben und über das Wochenende bei 20°C mit 500 µM IPTG geschüttelt. Die Aufreinigung wurde meist mit vier Kulturen parallel ausgeführt. Dazu wurden die Bakterien in einer Kontron Biotek/Hermele Centrifon H-401 Rotor A6.9 bei 6000 rpm und 4°C 5 min sedimentiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall soweit aufgeschlossen, bis die Suspension aufklarte. Alle Schritte erfolgten mit gekühlten Puffer und auf Eis. Beim Sonifizieren wurde darauf geachtet nur kurze Zeiten zu wählen, um die Proteolyse so gering wie möglich zu halten. Die Suspensionen wurden in einer Ultrazentrifuge (Optima, TLX-120 Beckman, Rotor TLA1004) bei 36000 rpm, 4°C, 30-60 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die Fraktion löslicher Proteine. Glutathion-S-Sepharose "Beads" (Amersham, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden 2x in Waschpuffer gewaschen, ca. 1 ml "Beads" wurde zu jeweils 10 ml Überstand gegeben und in einem 50 ml konischen Röhrchen bei 4°C 1 h inkubiert, um die GST-fusionierten Proteine zu binden. Das Auswaschen der anderen zelleigenen Proteine erfolgte durch Abzentrifugieren (5 min, 3000 rpm, 4°C in Heraeus Sepatec Omnifuge 2.ORS Heraeus, Osterode, Deutschland) und mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer. Alternativ wurde ein 50 ml Säulchen bis zur 3-5 ml Marke mit "Beads" geladen, mit 10 ml Waschpuffer equilibriert und mit 30-50 ml Bakterienlysats beladen. Die Säulchen wurden mehrmals mit Waschpuffer gespült. Die GST-Proteine wurden mit 10-100 mM Glutathion eluiert, oder, wenn angemerkt, für eine empirisch ermittelte Zeit von den "Beads" mittels Thrombin (5 U Thrombin pro 1 ml "Beads") gespalten. Die Spaltung wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF (Stock 200 mM in EtOH) beendet.

**Lysepuffer**

TRIS pH 8	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	5 mM
DTT	1 mM
Proteaseinhibitoren	

**Waschpuffer**

TRIS pH 8	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Detergenz für ersten Waschschrift	0.2%
Proteaseinhibitoren	

**Elutionspuffer**

TRIS pH 8	10 mM
Glutathion pH 7-8	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

**Thrombinpuffer**

TRIS pH 8	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	1 mM

Wurden Proteine zur Mikroinjektion präpariert, so wurde den Puffern kein EDTA beigegeben.

#### 2.4.4.1. Präparation der Proteine für “Pulldown“ Versuche und Mikroinjektion

Die Proteinmenge wurde bestimmt und ein Aliquot (ca. 10 µg) auf ein 12.5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt und nur solche Präparationen ohne detektierbare Degradations-Banden verwandt. Das Protein wurde über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer MI dialysiert.

##### **Dialysepuffer MI**

TRIS pH 8	10 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
DTT	0.1 mM

Das Protein wurde in Centricon Filtern (Millipore, Bedford, USA) auf die gewünschte Konzentration eingengt. Danach aliquotiert, schockgefroren und bei –80°C gelagert.

#### 2.4.4.2. Präparation der Proteine für Nukleations- und Bindungsversuche

Nach Elution oder Spaltung der Proteine von den “Beads“ wurden diese über eine MonoQ Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in einem FPLC Gerät (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gereinigt. Dazu wurde die Säule mit Puffer QA equilibriert und ein Gradient von QA nach QB gefahren. Die Fraktionen, die das interessierende Protein enthielten, wurden vereint, und durch MALDI-Massenspektroskopie analysiert (Scripps Institute Research Facilities, LaJolla, USA). Dieses Vorgehen erschien deshalb sinnvoll, da die Interaktionen von GST-VCA vor allem von den letzte 3 Aminosäuren abhängen (Marchand et al., 2001), und diese sehr leicht bei der Präparation abgespalten werden. Die Proteine wurden gegen Dialysepuffer BI dialysiert, nachfolgend konzentriert und bei –80°C gelagert.

**QA**

TRIS-HCl pH 8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	100 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

**QB**

QA mit 400 mM NaCl

**Dialysepuffer BI**

TRIS pH 8	10 mM
DTT	1 mM
H <sub>2</sub> O dest	

**2.4.4.3. Besonderheiten bei der Präparation des VC Konstruktes**

Bei der Aufreinigung des VC Konstruktes ergab sich ein Problem, da das Fragment keine sauren oder anders spezifisch geladenen Aminosäuren enthielt, so dass sich keine Säule fand, über die es mittels FPLC gereinigt werden konnte. Auf die Reinigung mittels FPLC wurde deshalb verzichtet und nur solche Präparationen, die in der MALDI-Massenspektroskopie keinen Abbau erkennen ließen, verwandt.

**2.4.4.4. Aufreinigung von “His-Tag“ Proteinen aus *Escherichia coli***

Proteine, die an ihrem N-terminalen Ende einen “Tag“ aus sechs Histidinen hatten, wurden mit einem Qiagen Kit (2.1) nach Anweisung des Herstellers über Affinitätssäulen-Chromatographie mit Ni-NTA und Superdex 75 Säulen gereinigt.

**2.4.5. GST-“Pulldown“ Versuche**

“Pulldown“ Versuche wurden in verschiedenen Modifikationen nach demselben Standardprotokoll (Linder *et al.*, 1999) angefertigt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden pro Vertiefung einer “6-Wellplatte“ für fünf bis sieben Tage kultiviert. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und durch die Zugabe von je 200 µl Ripa-Puffer oder Lysispuffer zu jeder Vertiefung lysiert. Sie wurden auf Eis von den Zellkulturschalen abgekratzt und die Proben 5

min durch Rotation im Kühlraum lysiert. Alternativ wurden die Lysate auf Eis 5x im Sonifyer gepulst. Dann wurden sie 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) und der Überstand zu den Glutathion-S-Sepharose “Beads“ gegeben, die zuvor für 1 h mit einem GST-Fusionsprotein inkubiert worden waren. An 500 µl gewaschene “Beads“ wurden im Schnitt 50-100 µg GST-Fusionsprotein gebunden. “Beads“ und Lysat wurden für 1 h im Kühlraum koinkubiert. Zu 500 µl beladenen “Beads“ wurde ein Lysat aus ca.  $3 \times 10^6$  Zellen gegeben. Zum Schluss wurden die “Beads“ mehrmals in Ripa- bzw. Waschpuffer gewaschen, dazwischengeschaltete Zentrifugationsschritte erfolgten bei 2000 rpm, 4°C für 30 sec. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand völlig abgenommen und die Proben nach Zugabe von mindestens 100 µl Probenpuffer pro 500 µl “Beads“ wie beschrieben durch Elektrophorese und Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils “Beads“ genommen, die nur mit GST inkubiert worden waren. In keinem Fall zeigten diese ein Signal für das untersuchte Protein.

**Ripa-Puffer**

TRIS pH 8	10 mM
NaCl	140 mM
TritonX-100	1%
Proteaseinhibitoren	

**Lysispuffer**

TRIS pH 8	50 mM
NaCl	75 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	1%
Proteaseinhibitoren	

**Waschpuffer**

TRIS pH 7.4	50 mM
Triton X-100	0.1%
Glycerol	10%

**2.5. Mikroinjektion**

Für die Mikroinjektion wurden Makrophagen für fünf bis sieben Tage auf Deckgläschen (Cellocate Coverslip, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angezüchtet. Die Mikroinjektion wurde mit einem Transjektor 5246 von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und einem “Compic Inject“ Micromanipulator (Cell Biology Trading, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Proteine wurden in der angegebenen Konzentration ins Zytoplasma injiziert. Es wurden jeweils Kontrollinjektionen mit GST in der gleichen Konzentration durchgeführt. Durch Injektion mit genügend hohem Druck konnte in den meisten Zellen eine

Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts ausgelöst werden. In manchen Versuchen wurde dieser Effekt ausgenutzt. Um die spezifischen Auswirkungen eines injizierten Proteins zu untersuchen, wurden die Zellen mindestens 1 h nach Injektion nachinkubiert. Injizierte Zellen konnten durch Koinjektion eines Markers identifiziert werden: entweder wurde Ratten IgG 5 mg/ml (Dianova, Hamburg, Deutschland) koinjiziert, das nachfolgend mit einem Antikörper gegen Ratten IgG angefärbt wurde, oder bereits FITC-markiertes Ratten IgG 10 mg/ml (Dianova., Hamburg, Deutschland) wurde als Marker verwendet.

Proteine wurden mit Mikroinjektionspuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Nach der Mikroinjektion und Nachinkubation wurden die Zellen wie unter 2.6. beschrieben fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

### **Mikroinjektionspuffer**

TRIS pH 7.4	500 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
H <sub>2</sub> O dest.	
steril filtrieren	

## **2.6. Immunfluoreszenz und Mikroskopie**

### **2.6.1. Allgemeines**

Zur Durchführung von Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Makrophagen für fünf bis sieben Tage auf Deckgläschen angezüchtet.

### **2.6.2. Fixations- und Permeabilisationsverfahren**

Zur Darstellung der meisten Zytoskelettstrukturen, sowie des injizierten Ratten IgGs, eignet sich folgende Standardfixierung/Permeabilisierung.

#### **Standardprotokoll Fixierung/Permeabilisierung**

Fixierung (10 min):	3.7% Formaldehyd in PBS
Lyse (5 min):	Aceton (−20 °C)
Waschen (5 min):	PBS/1% BSA

Mit dieser Methode ist die Darstellung von Mikrotubuli nicht möglich, da diese sehr instabil sind.

Zur Anfärbung der Mikrotubuli wurde folgendes Verfahren, modifiziert nach Koonce *et al.*, 1986 angewandt, wobei darauf zu achten ist, dass alle verwendeten Substanzen Raumtemperatur haben, da es sonst zur schnellen Depolymerisation der Mikrotubuli kommt.

### **Fixierung/Permeabilisierung bei Mikrotubuli Färbung**

Lyse (1 min):	in 50% PHEM-Puffer + 1 mM Vanadat/5% Hexylenglycol/1% Brij 58
Waschen (1 min):	in 50% PHEM-Puffer
Fixierung (10 min):	in 50% PHEM-Puffer/1% Glutaraldehyd
Waschen (5 min):	PBS/1% BSA

### **PHEM-Puffer**

HEPES	25 mM
PIPES pH 6.1	20 mM
EGTA	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Bei WASp Tubulin Kofärbungen wurde folgendes Fixierungs/Permeabilisations-Protokoll nach Tian *et al.*, 2000 angewandt: Die Zellen wurden durch Inkubation in Zytoskelettpuffer für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und lysiert und anschließend 5 min in PBS/1% BSA gewaschen.

### **Zytoskelettpuffer**

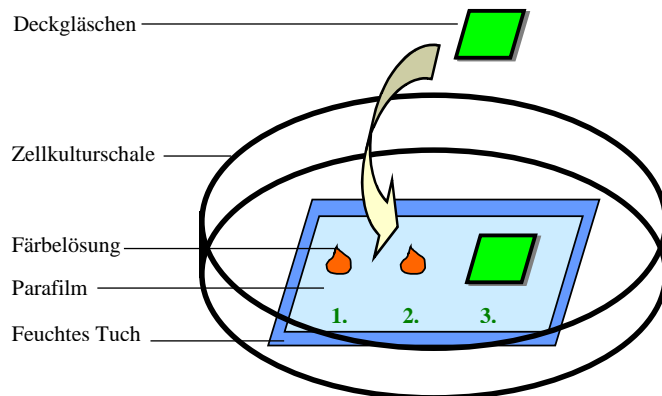
Formaldehyd	4%
TritonX-100	0.1%
PIPES pH 7.4	80 mM
EGTA	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Glycerol	30%

## **2.6.3. Fluoreszenz-Färbungen**

### **2.6.3.1. Färbung mit Phalloidin**

Alle Färbeporgänge erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Ein ca. 25 µl großer Tropfen mit Färbelösung wurde auf ein Stück Parafilm gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten daraufgelegt (Abb.2.1.). Bei Phalloidin Färbungen (Alexa-568

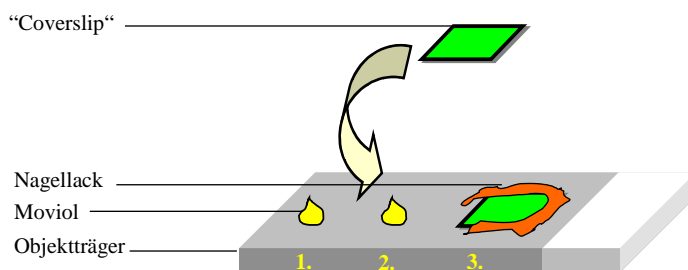
markiertes Phalloidin; Molecular Probes, Leiden, Niederlande 1:200 in PBS oder Alexa-488 markiertes Phalloidin 1:50 in PBS) wurde eine Inkubationszeit von 20 min eingehalten.



**Abb.2.1. Schematische Darstellung des Block- bzw. Färbevorgangs bei der Herstellung von Fluoreszenz-markierten Präparaten**

Makrophagen wurden für fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert und anschließend fixiert. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Färbelösung (ca. 30 µl) auf Parafilm gelegt und in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Beendigung des Färbevorgangs wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einigen µl PBS vom Parafilm losgespült, um die Zellen nicht zu beschädigen. Darauf folgten 3 Waschschrte zu je 5 min in PBS. Schließlich wurden die Zellen in Moviol (Calbiochem, Schwalbach, Deutschland) einbetten, das *p*-Phenylendiamin als “anti-fading“ Substanz enthielt. Versiegelt wurden die Proben mit Nagellack (Abb.2.2.). Die Präparate waren bei 4°C einige Monate lang haltbar.



**Abb.2.2. Schematische Darstellung der Einbettung nach abgeschlossener Färbung**

Die Deckgläschen wurden mit der Zell-Seite nach unten auf den Objektträger gelegt, und die Zellen damit im Moviol eingebettet. Die Abdichtung erfolgte mit Nagellack.



### Einbettmedium

Moviol: 2.4 g + Glycerin: 6.0 g

vortexen

+ 6 ml H<sub>2</sub>O

vortexen

3 h RT zwischendurch vortexen

+ 12 ml 0.2 M TRIS pH 8.5

10 min 50°C erhitzen, zwischendurch vortexen

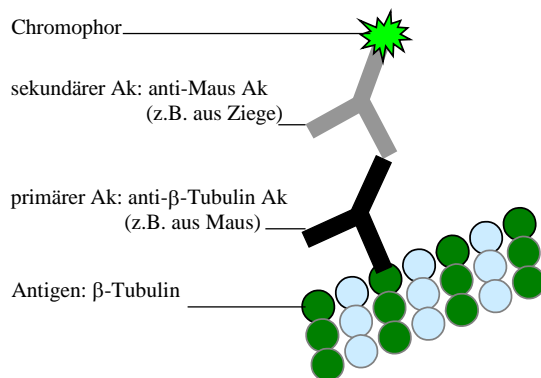
+ 1 mg/ml p-Phenylendiamin

15 min 7500 U

Überstand aliquotieren und in Eppendorfgefäßen (fest verschließen) bei -20°C lagern

### 3.6.3.2. Färbung mit Antikörpern

Allen Immunfluoreszenz-Färbungen mit primärem und sekundärem Antikörpern liegt ein gemeinsames Prinzip zugrunde, das in Abbildung 2.3. skizziert ist.



#### Abb.2.3. Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung mit primärem und sekundärem Antikörper am Beispiel des β-Tubulins

Der primäre Antikörper erkennt das spezifische Antigen, der sekundäre ist gegen die schwere Kette des ersten gerichtet und mit einem Chromophor gekoppelt. Das Lichtsignal des Chromophors wird im Mikroskop detektiert.

Zuerst wurden unspezifische Bindungen durch einen Blockvorgang (15 min) mit 5% Humanserum und 5% Ziegenserum in PBS/1% BSA abgesättigt. Darauf folgte ein Waschschriff (5 min) in PBS/1% BSA und die Färbung mit dem primären Antikörper für 45 min in einer feuchten Kammer (Abb.2.1.). Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper ist aufgeführt. Es folgten drei 5 min Waschschriffe in PBS. Nach Bedarf konnte nun mit einem zweiten oder dritten primären Antikörper inkubiert werden. Die Zellen wurden anschließend für 30 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Alle sekundären Antikörper (entweder Alexa-568 markiert oder Alexa-488 markiert, Molekular Probes, Leiden, Niederlande) wurden 1:200 in PBS verdünnt. Cy-5 Ziege anti-Maus und FITC Ziege

anti-Ratte Antikörper wurden von Dianova (Hamburg, Deutschland) bezogen. Die Deckgläschen wurden 3x 5 min in PBS gewaschen und in Moviol mit *p*-Phenylendiamin eingebettet. Die Präparate wurden mit Nagellack versiegelt (Abb.2.2.).

### Liste der in dieser Arbeit verwandten Antikörper

anti- $\alpha$ -Tubulin	monoklonal Maus Klon B 512 Antikörper (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	1:100 in PBS
anti- $\alpha$ -Tubulin	monoklonal Ratte (Serotec, Oxford, England)	ca. 1:50 in PBS
anti- $\beta$ -Tubulin	monoklonal Maus Klon 2.1. Antikörper (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	ca. 1:100 in PBS
anti-Aktin Antikörper	monoklonal Maus MAB 1501 (Chemicon, Temencula, USA)	1:200 in PBS
anti-Vinkulin Antikörper	monoklonal Maus (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	1:100 in PBS
anti-p34 (ARPC 2) und anti-p41 (ARPC 1) Antikörper)	polyklonal Kaninchen, gegen p34 oder p41 Untereinheit (von Dr. H.N. Higgs )	1:5 bzw. 1:100 in PBS
anti-WASp 3D8.H5	monoklonal Maus, gegen N-terminalen WASp Abschnitt (von Dr. D. Nelson)	1:50 in PBS

### 2.6.3.3. Mikroskopie und Bildverarbeitung

Bilder von Präparate wurden entweder in einem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) oder in einem konventionellen Fluoreszenz-Mikroskop mit einer Spot Digital Kamera (Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Konfokale Laserbilder wurden erzeugt, indem jeweils 2-4 verschiedene Schnittebenen überlagert wurden, die sich ca. 0.2-1  $\mu$ m auseinander befanden. Als bildverarbeitende Software dienten Microsoft Imaging für Windows NT sowie Adobe Photoshop, Version 8.0.

#### 2.6.4. Quantifizierung des intrazellulären polymerisierten Aktins

Zur Bestimmung des totalen intrazellulären polymerisierten Aktins wurden Epifluoreszenzmessungen durchgeführt. In Proben mit mikroinjizierten Zellen wurden mit Alexa-568 Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) das intrazelluläre polymerisierte Aktin angefärbt (siehe oben). Die Fluoreszenz wurde mit einer C-CCD4880 Kamera (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland), die auf ein Leica DM RD Epifluoreszenz-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) montiert wurde, gemessen. Die Gesamtfluoreszenz einzelner Zellen, sowie die durch die jeweilige Zelle eingenommen Fläche, wurden mit der ARGUS-50 Software (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland) berechnet. Für jedes mikroinjizierte Konstrukt wurden 30 Zellen gemessen. Die Signifikanz wurde mit dem Student-T-Test bei StartiBot.com berechnet. Werte kleiner 0.05 wurden als signifikant angesehen.

### 2.7. In vitro Bindungs- und Nukleationsversuche

#### 2.7.1. Aufreinigung von Aktin und Arp2/3 Komplex

Aktin wurde aus Aceton Puder aus Kaninchen Skelettmuskel isoliert (Sprudich und Watts, 1971). Dabei war es wichtig alle Schritte auf Eis oder im Kühlraum durchzuführen. Monomere wurden durch Gelfiltration über eine Sephacryl S-300 Säule (Amersham, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in G-Puffer gewonnen (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980). Aktin wurde mit Pyrenyliodoacetamide (Molecular Probes, Eugene, USA) markiert (Pollard und Cooper, 1984). Das Ausmaß der Markierung wurde bestimmt unter Verwendung von einem Extinktions-Koeffizienten von  $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 344 nm für gebundenes Pyren und einem Extinktions-Koeffizienten von  $26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 290 nm (Houk *et al.*, 1974) für Aktin nach Korrektur für Pyren (Cooper *et al.*, 1983).

Arp2/3 Komplex wurde von Dr. H.N. Higgs und D.A. Kaiser aus tiefgefrorenem Rinderthymus isoliert (Higgs *et al.*, 1999) und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

**G-Puffer**

TRIS/HCl, pH 8.0	2 mM
ATP	0.2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.1 mM
DTT	0.5 mM
H <sub>2</sub> O dest.	

**2.7.2. Vorgehen bei Aktin Nukleationsversuchen im Fluorimeter**

Aktin Polymerisationsversuche wurden mit einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin durchgeführt (Pollard und Cooper, 1984). Dabei wurden Pyren-markiertes und unmarkiertes Aktin in einem Verhältnis gemischt, so dass eine Endkonzentration von 5% markierten Monomeren bei einer Gesamtkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  hergestellt wurde. Verdünnt wurde bei Bedarf mit G-Puffer. Ein Aliquot wurde in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und durch Zugabe von 0.1 Volumen 10E/M (RT für 2 min) zu  $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin konvertiert. Es folgte eine Verdünnung mit G-Puffer- $\text{Mg}^{2+}$ , so dass die Konzentration nach Zugabe der restlichen Proteine 4  $\mu\text{M}$  Aktin betrug. Alle zusätzlichen Proteine (in G-Puffer- $\text{Mg}^{2+}$ ) wurden als separate Tropfen an die Seite des Eppendorf Gefäßes pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 10x KMEI gestartet. Die verschiedenen Proteine wurden schnell gemixt, die Lösung in eine Küvette pipettiert und mit der Datenkollektion begonnen. Pyren Fluoreszenz Daten (Exzitation bei 365 nm und Emission bei 407 nm) wurden mit einem PTI Alphascan Spektrofluorimeter (Photon Technology International, Santa Clara, USA) mit einer Auflösung von 1 Punkt/sec gesammelt. Die Verzögerung zwischen Zugabe des KMEI und der anderen Proteine war im Mittel weniger als 5 sec, es dauerte zwischen 12-17 sec vom Starten der Reaktion bis zur Datenaufnahme im Fluorimeter. Im fertigen Reaktionsansatz fanden sich folgende Endkonzentrationen der Reaktionspartner: 4  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin, 10 mM Imidazol, pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Die Zugabe von GST alleine zeigte keinen Einfluss auf die Polymerisierungs-Rate und auch die Zugabe von inaktivem Arp2/3 Komplex allein führte nur zu einem ganz geringen Anstieg der Aktin Polymerisations-Rate.

**G-Puffer- $\text{Mg}^{2+}$** 

TRIS/HCl pH 8.0	2 mM
DTT	0.5 mM
ATP	0.2 mM
$\text{MgCl}_2$	0.1 mM

**10xKMEI-Puffer**

Imidazol pH 7	100 mM
KCl	500 mM
EGTA	10 mM
$\text{MgCl}_2$	10 mM

**10xE/M**

EGTA	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

**2.7.3. Berechnung der Polymerisations-Konstanten**

Die Konzentration von Aktin-Filament Enden wurde bei 80% Nukleation bestimmt, da sich nach diesem Zeitpunkt nur noch wenige Enden bilden (Higgs *et al.*, 1999). Die Anzahl freier “Barbed Ends“ wurde aus der Nukleations-Geschwindigkeit nach folgender Formel berechnet (Pollard, 1983):

$$R = k^+ (A)(\text{“Ends”})$$

$R$  = Elongationsrate,  $k^+$  ist die Assoziationskonstante:  $11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei pH 7 (Pollard, 1986),  $A$  ist die Konzentration von Aktin-Monomeren und “Ends“ ist die Konzentration wachsender Filament Enden. Die Konzentration an Enden kann also für jeden Zeitpunkt aus der Elongations-Rate bestimmt werden. Die Filament Enden eignen sich deshalb so hervorragend als Maß für die Nukleationseffektivität, da bei der Spontannukleation von Aktin-Monomeren das Formen neuer Filament energetisch recht ungünstig ist. Das Überkommen des Dimer und Trimer Stadiums ist ein seltenes Ereignis, und die Zunahme neuer Enden ist deshalb recht langsam. Durch Zugabe von aktiviertem Arp2/3 Komplex (z.B. durch GST-VCA) können diese ungünstigen Nukleationsstadien umgangen werden und mehr freie Filament Enden entstehen.

**2.7.4. Vorgehen bei Anisotropie Messungen**

Anisotropie Messungen wurden zur Bestimmung der Bindungs-Konstanten verschiedener WASp Konstrukten für Aktin oder Arp2/3 Komplex durchgeführt. (Blanchoin und Pollard, 1998). Rhodamin-markiertes, GST-freies, VCA kompetitierte dabei mit dem zu untersuchenden Protein um die Bindung an Arp2/3 Komplex oder Aktin. VCA-Rhodamin wurde freundlicherweise von Dr. J.-B. Marchand zur Verfügung gestellt. Für die Anisotropie Messungen wurde  $0.1 \mu\text{M}$  GST-freies WASp-VCA (Rhodamin-markiert) mit verschiedenen Bindungspartnern in 1xKMEI-Puffer/Thesit für 2 min bei RT inkubiert. Die Reaktion fand in Glasröhrchen statt. Wurde Aktin verwandt, so wurde dieses unmittelbar vor dem Gebrauch durch Zugabe von 0.1 Volumen 10xE/M und Inkubation bei RT für 2 min zu  $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin

konvertiert. Rhodamin wurde mit polarisiertem Licht bei 552 nm angeregt und die Emission wurde bei 574 nm durch horizontale und vertikale Polarisatoren detektiert. Die Anisotropie wurde in einem Alpha Scan Spektrofluorimeter (Photon Technologies International, Santa Clara, USA) gemessen. 20 Sekunden lang wurde jede Sekunde eine Messung gemacht und die durchschnittliche Anisotropie abgelesen. Die Daten wurden mit Kaleidograph Software (Synergy Software, Reading, USA) weiter ausgewertet.

### **10xKMEI-Puffer/Thesit**

Imidazol pH7	100 nM
KCl	500 mM
EGTA	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Thesit (Roche Biochemicals, Basel, Schweiz)	0.025%

### **2.7.5. Berechnung von Bindungs-Konstanten**

Die Anisotropie war abhängig von der Konzentration des kompetitierenden Konstrukts. Um einen leicht vergleichbaren Wert zu erhalten wurde deshalb die Dissoziationsequilibriums-Konstante  $K_2$  nach folgender Formel berechnet (nach Marchand *et al.*, 2001):

$$R = R_f + (R_b - R_f) / [K_d (C + K_2) / K_2 L + 1]$$

$K_d$  = Dissoziationsequilibriums-Konstante für markiertes WASp-VCA und Aktin oder Arp2/3 Komplex, L ist die Gesamtkonzentration von Aktin oder Arp2/3 Komplex, C ist die Konzentration des kompetitierenden Liganden,  $K_2$  ist die  $K_d$  des kompetitierenden Konstrukts für Aktin oder Arp2/3 Komplex,  $R_f$  der Anisotropiewert für freies Rhodamin-VCA und  $R_b$  die Anisotropie von an den Liganden gebundem Rhodamin-VCA.

### **2.7.6. Observation von Aktin-Filamenten unter dem Licht-Mikroskop**

Die Versuche wurden unter Anleitung von L. Blanchoin gemäss eines von ihm entwickelten Versuchsaufbaus durchgeführt (Blanchoin *et al.*, 2000a). Aktin-Monomere wurden bei 22°C in einem Eppendorf Gefäß für 20 Minuten polymerisiert. Aktin-Monomere wurden dafür im Verhältnis 1:9 mit 10xKMEI vermischt. Aktin lag in einer Endkonzentration von 2 µM vor und Alexa 568-Phalloidin wurde in äquimolarem Verhältnis zu Beginn der Reaktion

zugegeben. Die Reaktion lief in G-Puffer ab. Arp2/3 Komplex lag in einer Endkonzentration von 60 nM vor. WASp Konstrukte wurden in der jeweils angegebenen Konzentration verwandt.

Nach Ablauf der Polymerisation wurden die Filamente 2x 1:50 in “Motility Buffer“ verdünnt und 1 µl wurde auf einen mit Polylysine bedecktes Deckgläschen aufgetragen. Die Fluoreszenz der Filamente wurde mit einem Olympus IX Mikroskop (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) beurteilt und Bilder mit einer Hamamatsu ORCA CCD Digitalkamera (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland) erstellt. Die Länge der Filamente wurde mit der MetaMorph Software (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) per Hand vermessen. Die Zahl der Filamente wurde von Hand ausgezählt, wobei das Mutterfilament jeweils mitgezählt wurde.

**”Motility-Buffer”**

4xAB	400 µl
DTT (1 M)	320 µl
Glucose (100 mM)	32 µl
Katalase (1mg/ml)	32 µl
Glucose Oxidase (10 mg/ml)	16 µl
Methylcellulose 2%	400µl
H <sub>2</sub> O	320 µl

**ABx4**

Imidazol pH 7.4	100 mM
KCl	100 mM
EGTA	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	16 mM

## **Ein Versuch ist nichts, es zählt nur das Ergebnis**

George Bernard Shaw (1856-1950)  
anglo-irischer Dramatiker, Nobelpreis für Literatur 1925



### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Herstellung der WASp-Polyprolin und -VCA Konstrukte, sowie C-terminaler Trunkationen**

##### **3.1.1. Bezeichnung und Herstellung der Konstrukte**

Proteine der WASp-Familie sind wichtige Regulatoren der Aktin Polymerisation, da sie die Aktin Nukleation durch Aktivierung des Arp2/3 Komplexes beschleunigen können (Übersicht bei Higgs und Pollard, 1999). WASp wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, seine Homologe N-WASP und Scar/WAVE sind hingegen in vielen Geweben zu finden (Miki *et al.*, 1996; Bear *et al.*, 1998). Hämatopoetische Zelllinien bei WAS Patienten haben ein ungeordnetes Aktin-Zytoskelett. Betroffene Zellen weisen Funktionseinschränkung auf, was die zentrale Rolle von WASp bei der Zytoskelett-Regulation unterstreicht (Überblick in Ochs, 1998). Um die biochemischen Eigenschaften, wie auch die zellulären Aufgaben einzelner WASp Regionen genauer zu analysieren, wurden verschiedene Regionen des Proteins kloniert. Durch PCR mit Vollängen-WASp als “Template“ wurden mittels geeigneter “Primer“ (siehe Auflistung in Material und Methoden) die entsprechenden Konstrukte hergestellt. Nach Verdau mit passenden Restriktionsenzymen wurden die Konstrukte der einzelnen Regionen in pGEX-2T Vektor ligiert und in DH5 $\alpha$  *Escherichia coli* transformiert. Nach Selektion auf Insert wurden einige Klone gepickt, über Nacht angezüchtet und sequenziert. Nur fehlerlose Klone wurden für die weiteren Versuche benützt. Die Proteine wurden über eine Glutathionsäule gereinigt. Für die zellbiologischen Versuche wurden die Reinheit und Größe der Proteine mittels SDS-Gel Elektrophorese und Coomassie Detektion überprüft. Nur Präparationen ohne sichtbaren Abbau wurden im Weiteren verwendet. Für biochemische Analysen wurde durch Massenspektroskopie sichergestellt, dass das Konstrukt in reiner Form und in Volllänge vorlag.

### 3.1.2. “Mapping“ der Konstrukte

Zur Orientierung sind in Abbildung 3.1. und 3.2. die DNS- beziehungsweise Proteinsequenz von WASp dargestellt. Für die weiteren Versuche wichtige Bereiche sind gekennzeichnet.

```

1  agcctcgcca gagaagacaa gggcagaaag caccatgagt gggggcccaa tgggaggaag
61  gcccgggggc cgaggagcac cagcggttca gcagaacata ccctccaccc tcctccagga
121 ccacgagaac cagcgactct ttgagatgct tggacgaaaa tgcttgacgc tggccactgc
181 agttgttcag ctgtacctgg cgctgcccc tggagctgag cactggacca aggagcattg
241 tggggctgtg tgcttcgtga aggataaccc ccagaagtcc tacttcatcc gcctttacgg
301 ccttcaggct ggtcggctgc tctgggaaca ggagctgtac tcacagcttg tctactccac
361 cccaccccc ttcttcaca ccttcgctgg agatgactgc caagcggggc tgaactttgc
421 agacgaggac gaggcccagg ccttcggggc cctcgtgcag gagaagatac aaaaaaggaa
481 tcagaggcaa agtggagaca gacgccagct acccccacca ccaacaccag ccaatgaaga
541 gagaagagga gggctccac ccctgcccct gcatccaggt ggagaccaag gaggccctcc
601 agtgggtccg ctctccctgg ggctggcgac agtggacatc cagaaccctg acatcacgag
661 ttcacgatac cgtgggctcc cagcacctgg acctagccca gctgataaga aacgctcagg
721 gaagaagaag atcagcaaag ctgatattgg tgcaccaggt ggattcaagc atgtcagcca
781 cgtgggggtg gacccccaga atggatttga cgtgaacaac ctcgaccag atctgcggag
841 tctgttctcc agggcaggaa tcagcgaggc ccagctcacc gacgccgaga cctctaaact
901 tatctacgac ttcattgagg accaggggtg gctggaggct gtgcggcagg agatgaggcg
961 ccaggagcca cttcgcgcgc cccacccgc atctcgagga gggaaccagc tccccgggcc
1021 ccctattgtg gggggtaaca agggctgttc tggccactg cccctgtac ctttggggat
1081 tgccccaccc ccaccaacac cccggggacc cccaccccca ggccgagggg gccctccacc
1141 accaccccct ccagctactg gacgttctgg accactgccc cctccacccc ctggagctgg
1201 tggggcaccc atgccaccac caccgccacc accgccaccg ccgcccagct ccgggaatgg
1261 accagcccct cccccactcc ctctgctct ggtgcctgcc gggggcctgg cccctggtgg
1321 gggtcgggga gcgcttttgg atcaaaccg gcagggaatt cagctgaaca agaccctgg
1381 ggccccagag agctcagcgc tgcagccacc acctcagagc tcagagggac tgggtggggc
1441 cctgatgcac gtgatgcaga agagaagcag agccatccac tcctccgacg aaggggagga
1501 ccaggctggc gatgaagatg aagatgatga atgggatgac tgagtggctg agttacttgc
1561 tgccctgtgc tcctccccgc aggacatggc tccccctcca cctgctctgt gccaccctc

```

```

1621 cactctcttc ttccagggcc cccaaccccc catttcttcc ccaccaaccc ctccaatgct
1681 gttatccctg cctgggtctc acactcaccc aacaatccca aggccctttt tatacaaaaa
1741 ttctcagttc tcttcactca aggattttta aagaaaaata aaagaattgt ctttctgtct
1801 ctctat

```

### Abb.3.1. WASp DNSsequenz

Gen Bank Nummer U12707. Nicht translatierte DNS Abschnitte sind in Grau dargestellt, translatierte schwarz. Orange ist die Polyprolin Domäne, rot die VCA Domäne.

```

1  MSGGPMGGRP GGRGAPAVQQ NIPSTLLGDH ENQRLFEMLG RKCLTLATAV VQLYLALQQG
61  AEHWTKEHCG AVCFVKDNQP KSYFIRLYGL QAGRLLWEQE LYSQLVYSTP TPFFHTFAGD
121 DCQAGLNFAD EDEAQAFRAL VQEKIQKRNQ RQSGDRRQLP PPPTPANEER RGGLQQLQLH
181 QGGDQGGQQV GPLSLGLATV DIQNPDISS RYRGLPAPGP SPADKKRSGK KKISKADIGA
241 PSGFKHVSHV GWDPQNGFDV NNLDPLRLSL FSRAGISEAQ LTDAETSKLI YDFIEDQGGL
301 EAVRQEMRRQ EPLPPPPPS RGGNQLPRPP IVGGNKGRSG PLPPVPLGIA PPPPTPRGPP
361 PPGRGGPPPP PPPATGRSGP LPPPPPGAGG PPMPPPPPP PPPPSSGNP APPPLPPALV
.....
421 PAGGLAPGGG RGALLDQIRQ GIQLNKTQGA PESSALQPPP QSSEGLVGAL MHVMQKRSRA
-----
481 IHSSDEGEDQ AGDEDEDDEW DD

```

### Abb.3.2. WASp Proteinsequenz

Proteinsequenz der in Abbildung 3.1. als translatierte Sequenz bezeichneten Region. Die Polyprolin Domäne ist in Orange und die VCA Domäne in Rot dargestellt; blauer Balken: VC, grüner Balken: CA, gepunkteter Balken: V, schwarzer Balken: C und gestrichelter Balken: A Region.

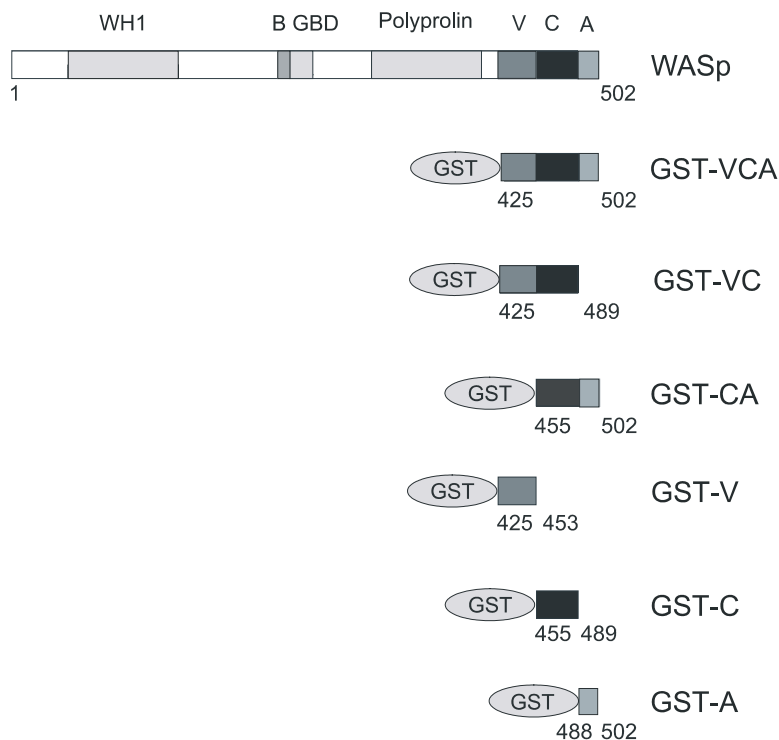
## 3.2. Zelluläre und biochemische Effekte der WASp C-terminalen Regionen

### 3.2.1. Charakterisierung der WASp-VCA Domäne und weiterer Teildomänen

In dieser Studie sollte die Funktion WASp C-terminaler Regionen in Bezug auf die Aktin Nukleation genauer untersucht werden. Die C-terminale, für die Aktin Nukleation verantwortliche, VCA Domäne von WASp-Familie Proteinen ist schon von einigen Gruppen in biochemischen “Assays” untersucht worden (Übersicht bei Higgs und Pollard, 1999). Eine

genaue Charakterisierung aller Teildomänen war aber noch nicht durchgeführt worden. Es war also nicht bekannt, welche Teildomänen der VCA Region für die Arp2/3 Komplex Aktivierung unabdingbar sind. Es sollte daher in diesem Ansatz die für die Aktin Nukleation minimal notwendige WASp Region *in vitro* und in Makrophagen identifiziert werden.

Die C-terminale Region von WASp, genannt VCA Domäne (AS 425-502), umfasst die Aktin-bindende V Region (“Verprolin-like“), die C Region (“Central“), die sowohl zur Aktin wie auch zur Arp2/3 Komplex Bindung beiträgt, sowie die hauptsächlich für die Arp2/3 Komplex Bindung verantwortliche A Region (Abb.3.3). Um die Teildomänen zu identifizieren, die Aktin Nukleation *in vitro* und in Zellen induzieren können, wurden verschieden Konstrukte der VCA Domäne hergestellt (Abb.3.3.; für DNS- und Proteinsequenz siehe Abb.3.1. bzw. 3.2.).



**Abb.3.3. Domänenstruktur von WASp und der in dieser Studie verwendeten GST-Fusionsproteine des C-Terminus**

WASp Homologie1 Domäne (WH1), Basische Region (B), GTPasen-Bindungs Domäne (GBD), Polyprolin Domäne. Der C-terminale Teil (ca. 105 Aminosäuren) von WASp beinhaltet eine WH2/Verprolin-homologe Region (V = Verprolin; 16-19 Aminosäuren), eine zentrale Region mit sehr limitierter Homologie zum Aktin-Monomer-bindenden Protein Cofilin (C = “Central“; 30-40 Aminosäuren) und eine Sequenz von sauren (A = “Acidic“) Aminosäuren; 15-20 Aminosäuren) (Übersicht bei Higgs und Pollard, 2001). Die Zahlen in der Abbildung bezeichnen die erste und letzte Aminosäure des GST-Fusionsproteins.

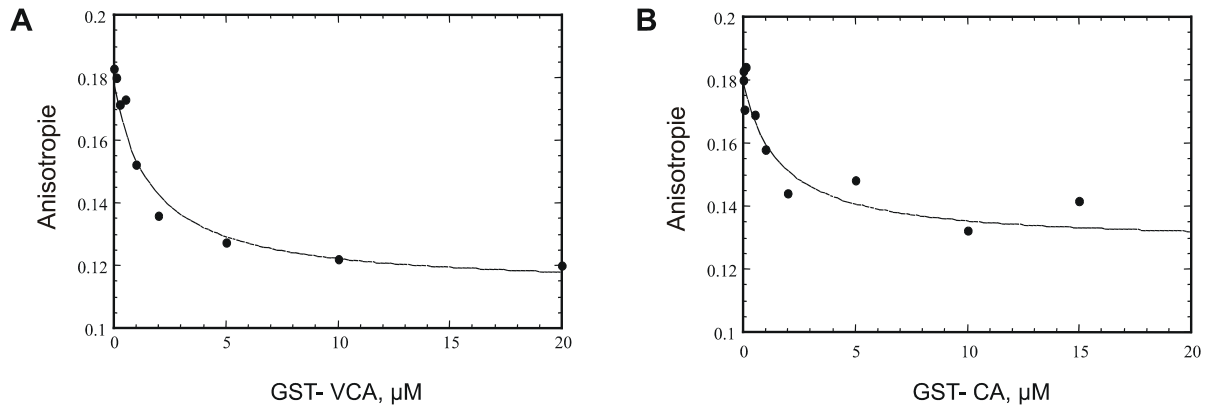
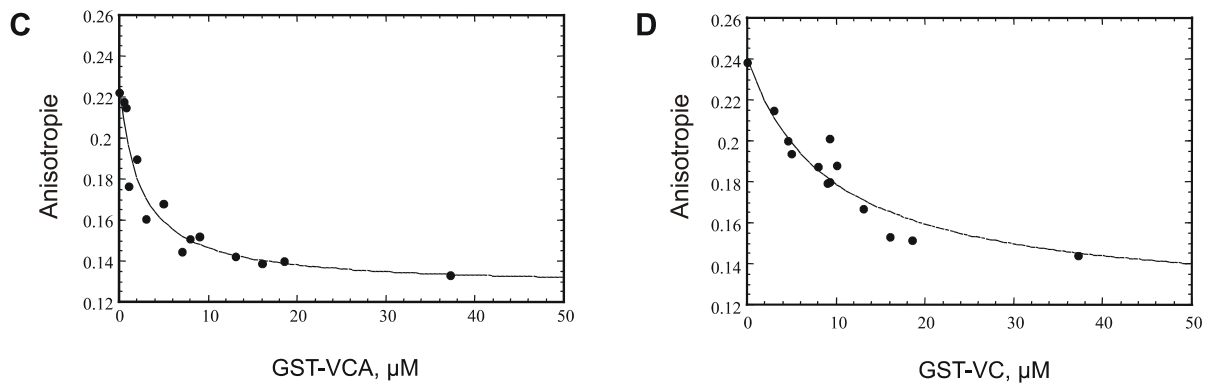
### 3.2.2. Anisotropie Messung, Prinzip und Versuchsanordnung

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zweier Proteine wurden in einem speziellen Fluorimeter Anisotropie Messungen durchgeführt. Kleine Proteine oder Teilchen zeigen auf Grund ihrer leichteren spontanen Beweglichkeit eine höhere Anisotropie als große Teilchen oder durch Bindung von zwei Proteinen entstandene größere Komplexe. Die Lichtstreuung, die durch ein Teilchen in einer Küvette erfolgte, wurde von zwei im 90 Grad Winkel zueinander stehenden Detektoren erfasst. In dieser Versuchsanordnung wurde ein mit Rhodamin-markiertes VCA Konstrukt verwendet, dessen Verdrängung von seinem Bindungspartner (Aktin oder Arp2/3 Komplex) durch das zu testende Protein gemessen wurde. So konnte die Affinität verschiedener Konstrukte für Arp2/3 Komplex oder Aktin bestimmt werden.

### 3.2.3. Bestimmung der Bindungsaffinität für Arp2/3 Komplex und Aktin-Monomere

Mit Anisotropie Messungen wurde die Dissoziationsequilibriums-Konstante ( $K_d$ ) für die Arp2/3 Komplex Bindung von GST-VCA zu  $0.11 \mu\text{M}$  bestimmt (Tabelle 3.1.; Abb.3.4., A). Die Bindung von GST-CA an Arp2/3 Komplex erfolgte mit derselben Affinität (Tabelle 3.1.; Abb.3.4., B). Die Bindung von GST-VC an Arp2/3 Komplex konnte mit dieser Versuchsanordnung nicht bestimmt werden, da selbst die höchsten getesteten Konzentrationen ( $500 \mu\text{M}$ ) nur zu einer leichten Abnahme der Anisotropie führten. Es kam nur zu einer Verdrängung von maximal 10% des Rhodamin-markierten VCA Konstrukts vom Arp2/3 Komplex, und die  $K_d$  war somit größer als  $1 \text{ mM}$ . GST-A band Arp2/3 Komplex mit einer Affinität von  $1.0 \mu\text{M}$  (Tabelle 3.1.). Diese Bindung war neunmal schwächer als für die GST-CA Region, was darauf hindeutet, dass auch die C Region mit an der Arp2/3 Komplex Bindung beteiligt ist, was in Einklang steht mit Beobachtungen einer weiteren Publikation (Marchand *et al.*, 2001).

Das GST-VCA Konstrukt band Aktin mit einer Dissoziationsequilibriums-Konstanten  $K_d$  von  $0.29 \mu\text{M}$  (Tabelle 3.1.; Abb.3.4., C), was der Bindungsaffinität von GST-freier VCA ( $0.6 \mu\text{M}$ ) (Marchand *et al.*, 2001) oder  $0.4 \mu\text{M}$  (Higgs *et al.*, 1999) vergleichbar war. GST-VC band Aktin mit einer  $K_d$  von  $1.1 \mu\text{M}$  (Tabelle 3.1.; Abb.3.4., D). GST-CA und GST-A hatten eine sehr niedrige Bindungsaffinität für Aktin-Monomere, die größer als  $1 \text{ mM}$  und damit in diesem Versuchsaufbau nicht genauer bestimmbar war.

**Arp2/3 Komplex Bindung****Aktin Bindung**

**Abb.3.4. Anisotropie Messungen zur Bestimmung der Bindungs-Konstanten der WASp C-terminalen Regionen für Arp2/3 Komplex und Aktin**

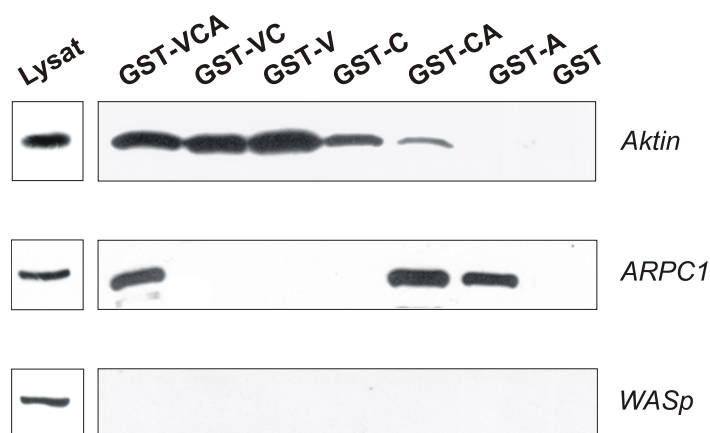
(A,B) Bindung von WASp GST-VCA (A) und GST-CA (B) an Arp2/3 Komplex, gemessen durch Fluoreszenz-Anisotropie der Rhodamin-markierten (GST-freien) WASp-VCA. Zunehmende Mengen von GST-VCA, GST-VC oder GST-CA kompetitierten mit VCA-Rhodamin um die Bindung an Arp2/3 Komplex. Eine Abnahme der Anisotropie zeigte eine stattgefunden Bindung durch das kompetitierende Konstrukt an. Die hypothetische Bindung von GST-VC an Arp2/3 Komplex war zu schwach, um in diesem "Assay" bestimmt zu werden. (C,D) Die Bindung von GST-VCA (C) und GST-VC (D) an monomeres Aktin wurde auf dieselbe Weise bestimmt. Die Bindung von GST-CA an Aktin war zu schwach, um durch Competition in dieser Versuchsanordnung bestimmt zu werden.

Konstrukt	$K_d$ für Aktin Bindung ( $\mu\text{M}$ )	$K_d$ for Arp2/3 Komplex Bindung ( $\mu\text{M}$ )	$K_d$ für Arp2/3 Komplex Stimulation (nM)	$IC_{50}$ für Inhibition von VCA-abhängiger Aktin Nukleation ( $\mu\text{M}$ )
GST-VCA	<b>0.29</b>	<b>0.11</b>	<b>5.3</b>	/
GST-VC	<b>1.14</b>	n.b.	<b>378</b>	n.b.
GST-CA	n.b.	<b>0.11</b>	n.b.	<b>0.08</b>
GST-A	n.b.	<b>1.0</b>	n.b.	<b>11</b>

**Tabelle 3.1. Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) von WASp C-terminalen GST-Fusionsproteinen für Aktin und Arp2/3 Komplex Bindung, sowie Aktivierungs-Konstanten und Inhibitions-Konstanten der Konstrukte für die VCA-abhängige Aktin Nukleation**

Die Bindung von GST-CA an Aktin und von GST-VC an Arp2/3 Komplex waren zu schwach um in dieser Versuchsanordnung bestimmt zu werden. GST-A zeigte keine Aktin Bindung. GST-CA und GST-A zeigten keine Stimulation der Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation, während GST-VC keine Inhibition der VCA-abhängigen Aktin Nukleation zeigte. "N.b." steht für "nicht bestimmbar".

In einem weiteren, semiquantitativen Ansatz wurden die verschiedenen C-terminalen WASp Konstrukte mit ihrem GST Anteil an Glutathion Kügelchen ("Beads") gebunden und mit Lysaten aus primären humanen Makrophagen inkubiert. Die Kügelchen wurden nach der Inkubation gründlich in Detergenzien-haltigem Puffer gewaschen, und die Bindung von Arp2/3 Komplex oder Aktin an die jeweiligen Konstrukte mit SDS-Gel Elektrophorese und anschließendem Western Blot überprüft. Hierbei ergaben sich zu den Anisotropie Messungen vergleichbare Ergebnisse (Abb.3.5.). GST-Fusionsproteine, die entweder die V oder C Region enthielten, waren in der Lage, Aktin aus Makrophagenlysaten zu extrahieren. Die Aktin Bindung an GST-C und GST-CA war schwach, an GST-A war sie nicht detektierbar. Alle Konstrukte, die die WASp-A Region enthielten, waren in der Lage Arp2/3 Komplex aus den Extrakten zu binden, während bei keinem Konstrukt, bei dem diese Region fehlte, eine Arp2/3 Komplex Bindung nachgewiesen werden konnte. Keines der aufgeführten Konstrukte konnte zelluläres WASp aus den Extrakten binden.



**Abb.3.5. Aktin und Arp2/3 Komplex Bindung der WASp C-terminalen Polypeptide im "Pulldown Assay"**  
 Western Blots von GST-"Pulldown" Versuchen wurden mit einem Aktin spezifischen Antikörper (oben) einem Antikörper gegen die ARPC1 (p41 Untereinheit) von Arp2/3 Komplex (mitte) oder mit einem WASp spezifischen Antikörper (der nicht den WASp C-Terminus erkennt, unten) inkubiert. Die für den "Pulldown" verwendeten Peptide sind jeweils über den entsprechenden Bahnen vermerkt. Die kleinen Ausschnitte links zeigen die Antikörperreaktivität mit Makrophagenlysate.

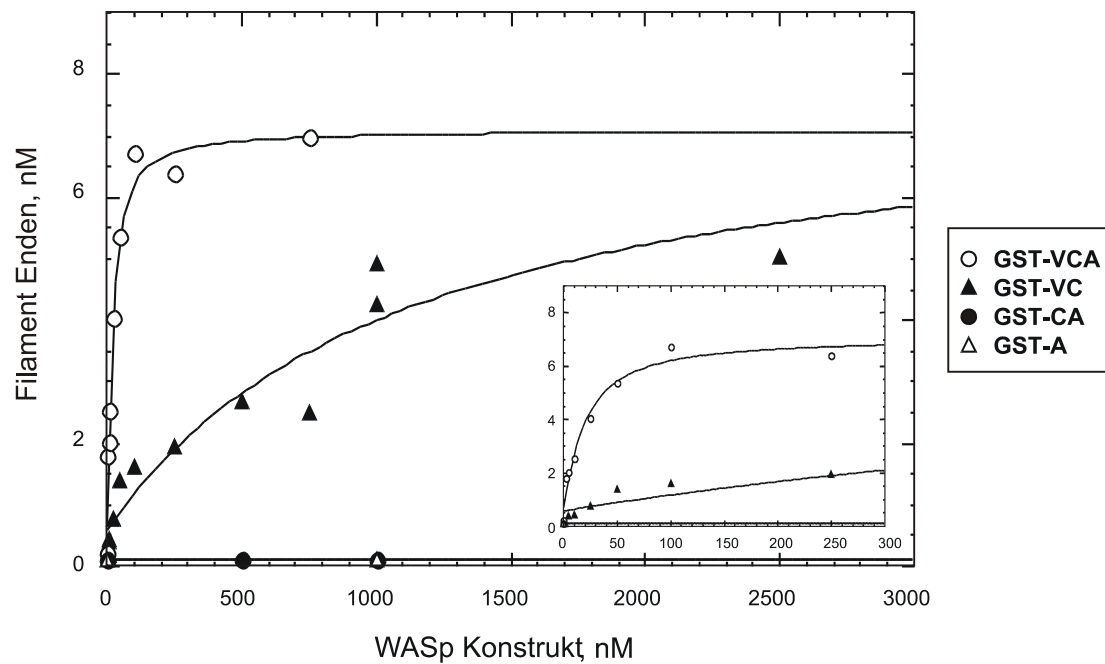
### 3.2.4. Nukleationsversuche: Prinzip und Versuchsaufbau

Um die Aktivierung von Arp2/3 Komplex durch die verschiedenen C-terminalen Konstrukte auf biochemischem Niveau zu untersuchen, wurden *in vitro* Nukleationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde Aktin aus Kaninchen Skelettmuskel verwendet und zu 5% mit Pyren markiert. Arp2/3 Komplex wurde aus Thymus von Rindern präpariert. In einem Fluorimeter konnte durch die Zunahme der Pyren Fluoreszenz, die den Einbau der markierten Aktin-Moleküle in Filamente anzeigt, das Ausmaß der Aktin Nukleation bestimmt werden. Die Geschwindigkeit, mit der dies im Vergleich zur unkatalysierten Aktin Nukleation ablief, war ein Maß für die Aktivierung von Arp2/3 Komplex. Zugabe von GST-VCA und Arp2/3 Komplex führte zu einer starken Beschleunigung der Bildung von Filament Enden, was als Maß für eine beschleunigte Nukleation gilt. Die Anzahl der durch Arp2/3 Komplex Aktivierung gebildeten Filament Enden wurde jeweils bei 80% Nukleation bestimmt, da nach diesem Zeitpunkt kaum neue Enden entstehen (Higgs *et al.*, 1999).

### 3.2.5. Aktivierung von Arp2/3 Komplex durch GST-VC

In Abwesenheit von Arp2/3 Komplex konnte keines der getesteten Konstrukte (GST-VCA, GST-VC, GST-CA, GST-A) eine über das spontane Nukleationsverhalten hinausgehende Nukleations-Aktivierung verursachen. In der Anwesenheit von Arp2/3 Komplex waren jedoch sowohl GST-VCA als auch GST-VC in der Lage, die Nukleation zu beschleunigen. Dies zeigt der Vergleich der Steigungen der beiden Kurven (Zunahme der Filament Enden gegen Zeit) (Abb.3.6.). Allerdings benötigten wir zur halbmaximalen Arp2/3 Komplex Aktivierung ca. 70-mal mehr GST-VC als GST-VCA (Tabelle 3.1.; Abb.3.6.). Die Nukleations-Aktivierung durch GST-VC war insofern erstaunlich als in den Anisotropie Messungen keine Bindung von Arp2/3 Komplex an GST-VC nachgewiesen werden konnte. GST-CA, GST-A oder GST alleine konnten Arp2/3 Komplex in keiner getesteten Konzentration aktivieren (Abb.3.6.). Auch eine Kombination von GST-CA und einem Peptid, das der V Region entsprach (Higgs *et al.*, 1999), konnte Arp2/3 Komplex in keiner der getesteten Konzentrationen aktivieren. GST-VCA musste also als kontinuierliches Polypeptid vorliegen, um seine Funktion ausüben zu können. Von allen getesteten Konstrukten war neben dem VCA Konstrukt einzig das VC Konstrukt in der Lage, Arp2/3 Komplex zu aktivieren.

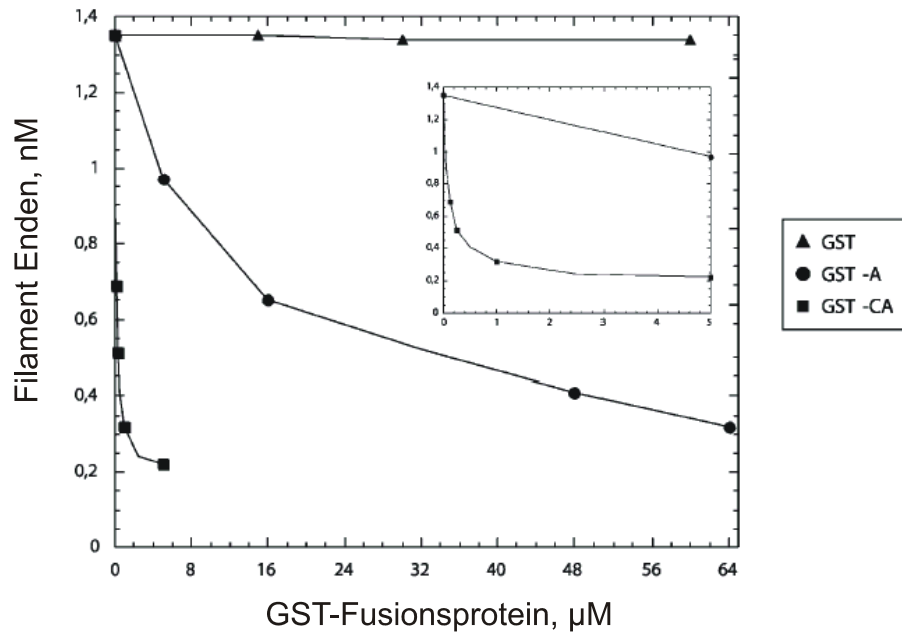




**Abb.3.6. GST-VC aktiviert die Arp2/3 Komplex-abhängige Aktin Nukleation *in vitro***

Nukleationsversuche wurden mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ -Aktin (davon 5% Pyren-markiert), 10 nM Arp2/3 Komplex und unterschiedlichen Mengen GST-VCA (offene Kreise), GST-VC (ausgefüllte Dreiecke), GST-CA (ausgefüllte Kreise) oder GST-A (offene Dreiecke) durchgeführt. Das Ausmaß der Nukleation wurde durch Zunahme der Pyren Fluoreszenz beim Einbau der Monomere in Filamente bestimmt und im Spektrofluorimeter gemessen. Die Anzahl der Filament Enden, die durch aktivierten Arp2/3 Komplex gebildet wurden, wurde aus der Steigung der Rohkurven bei 80% Polymerisation bestimmt (jeder dieser Punkte stellt einen Wert im abgebildeten Graph da). Die Stimulierung der Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation durch GST-VC war 70-mal schwächer als durch GST-VCA. Das kleine Bild zeigt den Beginn der Polymerisationskurve in höherer Auflösung.

Wie bereits von anderen beschrieben, wurde die VCA-abhängigen Arp2/3 Komplex Aktivierung durch Zugabe von GST-CA teilweise blockiert (Machesky und Insall, 1998) (Abb.3.7.). Diese Inhibition war sehr effektiv mit einer Inhibitions-Konstante  $\text{IC}_{50}$  (50% Inhibition) von 0.08  $\mu\text{M}$ . Wir fanden, dass auch das GST-A Konstrukt die Ausbildung neuer Filament Enden vermindern kann. Allerdings war es dabei 100-mal weniger effektiv ( $\text{IC}_{50}$  betrug 11  $\mu\text{M}$ ) (Abb.3.7.).



**Abb.3.7. GST-CA und GST-A inhibieren die VCA-induzierte Aktin Nukleation**

Nukleationsversuche wurden mit 4 µM  $Mg^{2+}$ -Aktin (5% Pyren-markiert), 10 nM Arp2/3 Komplex, 100 nM WASp-VCA (ohne GST) und unterschiedlichen Konzentrationen von GST-CA (ausgefüllte Quadrate), GST-A (ausgefüllte Kreise) und GST alleine (ausgefüllte Dreiecke) ausgeführt. Die Anzahl der sich spontan formierenden Filament Enden, ohne Zugabe von GST, Arp2/3 Komplex oder VCA war 0.12 nM. Das Ausmaß der Aktin Polymerisation wurde über die Pyren Fluoreszenz bestimmt. Die Zahl der durch Arp2/3 Komplex Aktivierung gebildeten Filament Enden wurde aus der Steigung einzelner Polymerisationskurven bei 80% Polymerisation bestimmt (diese Werte führen zu je einem Messpunkt in der Abbildung). Nach 80% Polymerisation bilden sich keine neuen Filament Enden mehr (Higgs *et al.*, 1999). Im Einschub ist ein Teil derselben Abbildung bei höherer Vergrößerung gezeigt.

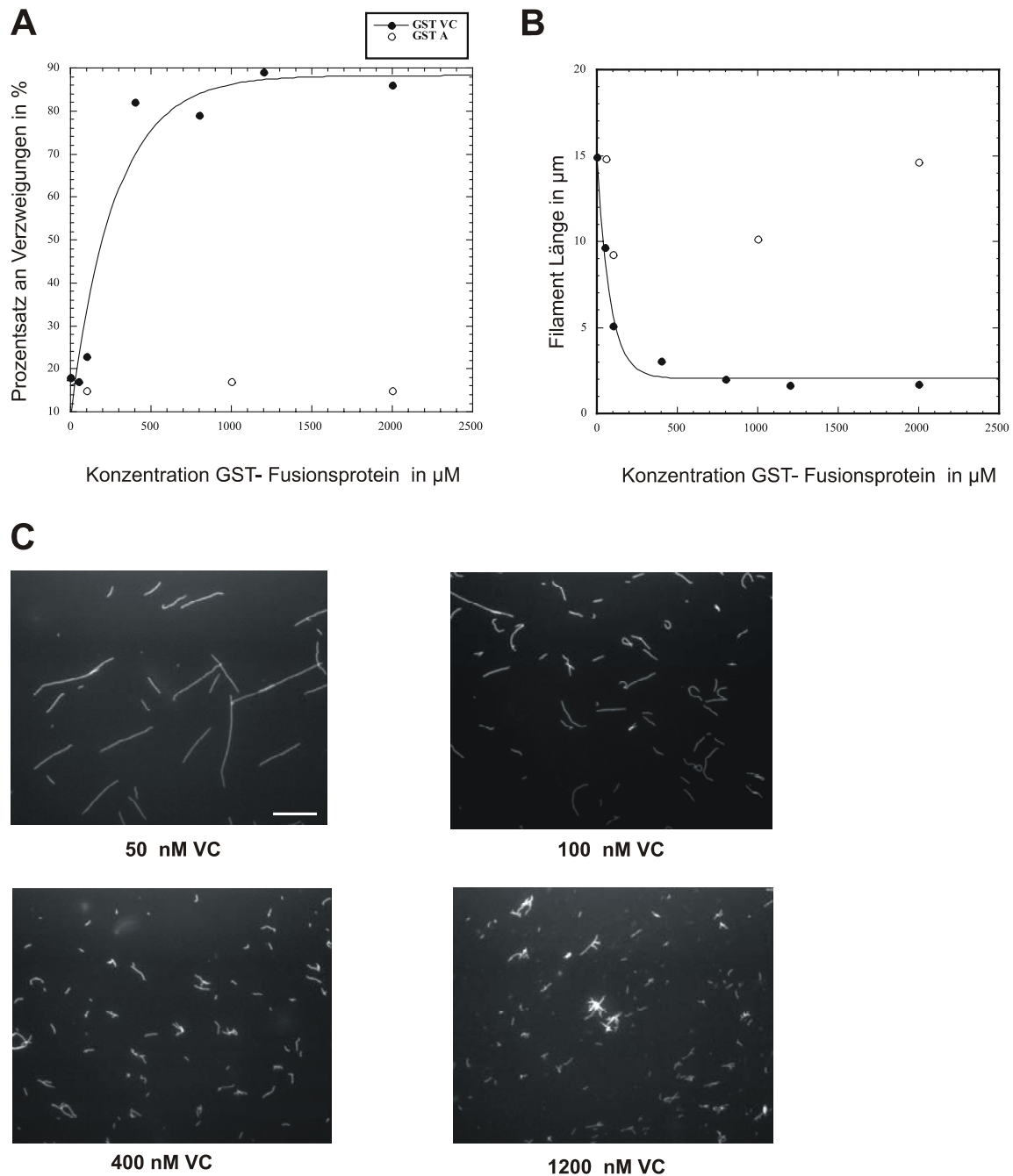
### 3.2.6. Direkte Observation von Aktin-Filamenten im Licht-Mikroskop, Prinzip und Versuchsaufbau

Aktin-Filamente wurden bei 22°C in Anwesenheit von Phalloidin polymerisiert. Phalloidin verhindert die Abdissoziation des Phosphatrestes vom neu gebildeten Filament und stabilisiert es auf diese Weise (Blanchoin *et al.*, 2000b). Durch Zugabe von gereinigtem Arp2/3 Komplex und unterschiedlichen GST-WASp Konstrukten kann die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes getestet werden (Blanchoin *et al.*, 2000a). Dabei zeigt sich eine Aktivierung in einer Ausbildung von vielen kurzen Filamenten und von Aktin-Filament Verzweigungen (Abb.3.8., C). Die Kürze der Filament ist dadurch bedingt, dass ab einer bestimmten Konzentration von aktivem Arp2/3 Komplex die Zahl der vorhandenen Aktin-Monomere für die Reaktion limitierend ist.

### 3.2.7. WASp-VC Region kann Arp2/3 Komplex zur Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen aktivieren

Die beschriebenen Versuche machen deutlich, dass GST-VC die minimal notwendige WASp Region darstellt, um die Arp2/3 Komplex-abhängige Aktin Nukleation *in vitro* zu aktivieren. Nun sollte der Frage nachgegangen werden, ob GST-VC Arp2/3 Komplex nur zur Bildung von einzelnen Filamenten aktivieren kann, oder ob auch die Verzweigungsfunktion des Arp2/3 Komplexes durch GST-VC aktiviert werden kann. Dazu führten wir *in vitro* Nukleationsversuche durch und analysierten die entstandenen Filamente mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Blanchoin *et al.*, 2000a). Aktin-Filamente wurden in Anwesenheit von Arp2/3 Komplex, Phalloidin und unterschiedlichen Konzentrationen von GST-VC polymerisiert (Abb.3.8., C). Wie bereits beschrieben, war Arp2/3 Komplex in Abwesenheit von WASp-Familie Proteinen inaktiv (Machesky *et al.*, 1999) und es kam nur zur Ausbildung einer minimalen Anzahl von Verzweigungen (Abb.3.8., A). Die Filament Länge unter diesen Bedingungen variierte erheblich und war vergleichbar mit zuvor beschriebenen Werten (Blanchoin *et al.*, 2000a) (Abb.3.8., B). Durch Zugabe ansteigender Konzentrationen an GST-VC kam es zur Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen (Abb.3.8., A). Die Filament Länge nahm dabei ab, da es zum Verbrauch der Aktin-Monomere durch die Vielzahl von aktivierten Arp2/3 Komplexen kam (Abb.3.8., B). GST-VC konnte also nicht nur die Nukleation von Filamenten durch Arp2/3 Komplex beschleunigen (Abb.3.6.), sondern war auch in der Lage, Arp2/3 Komplex zur Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen zu aktivieren (Abb.3.8.).

Der Verzweigungsgrad erreichte, wie zuvor auch für die VCA Domäne beschrieben (Blanchoin *et al.*, 2000a), einen Sättigungsgrad bei ca. 90%. Dabei war deutlich mehr GST-VC als VCA nötig, um diese Sättigung zu erreichen. Genaue Vergleiche sind aufgrund der etwas unterschiedlichen Reaktionsbedingungen aber nicht durchführbar. Auch die unter Sättigungsbedingungen erreichte Filament Länge ( $1.69 \mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$ ) war mit den zuvor für die VCA Domäne beschriebenen Werten vereinbar. Als Kontrolle in diesem Versuch diente das GST-A Konstrukt, welches die Aktin Nukleation selbstständig nicht aktivieren kann.



**Abb.3.8. Die WASp-VC Region ist für die Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen ausreichend**

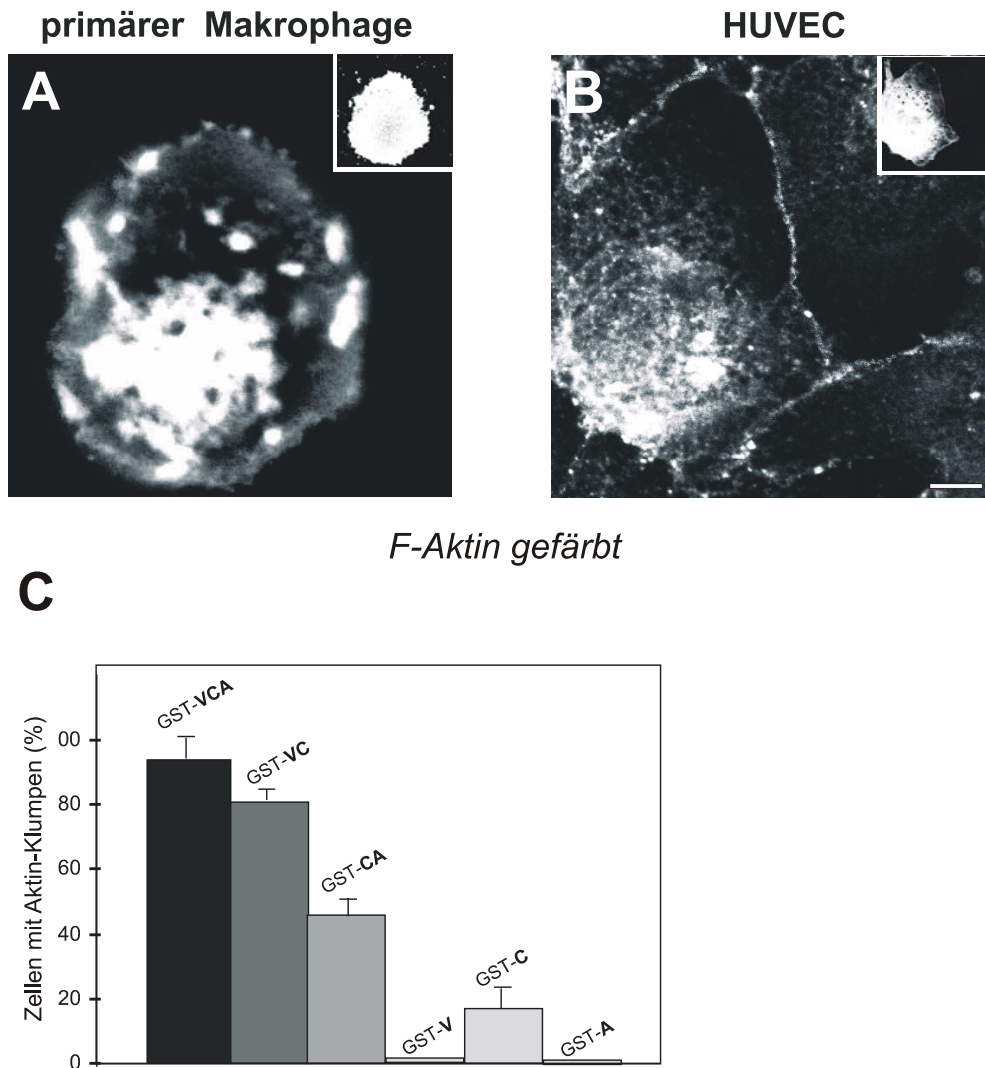
Die Experimente wurden mit  $2 \mu\text{M}$  Aktin und  $60 \text{ nM}$  Arp2/3 Komplex sowie unter Zugabe der aufgeführten Konstrukte durchgeführt. Aktin-Filamente wurden durch Alexa-568 Phalloidin angefärbt und stabilisiert. (A,B) zeigt die Anzahl der Verzweigungen bzw. die Filament Länge nach Polymerisation von Aktin-Filamenten in der Anwesenheit von Arp2/3 Komplex, Phalloidin und steigenden Konzentrationen von GST-VC. Mit Zunahme der Arp2/3 Komplex Aktivierung bei steigenden GST-VC Konzentrationen werden mehr Verzweigungen ausgebildet. Die Filamente werden durch Verbrauch der Aktin-Monomere kürzer. GST-A ist nicht in der Lage den Komplex in einen vollständig aktiven Zustand zu überführen und diente als Kontrolle. (C) Beispielhafte Darstellung des Effektes steigender GST-VC Konzentrationen auf die Aktin-Filament Bildung. Je 200-300 Filamente wurden vermessen, um die in (A) und (B) dargestellten Graphiken zu erhalten. Der weiße Maßstab entspricht  $10 \mu\text{m}$ .

### 3.2.8. Zelluläre Antworten auf die Mikroinjektion von GST-Fusionsproteinen der WASp C-terminalen Regionen

Weiterhin sollten die C-terminalen WASp Konstrukte auf ihre Eigenschaft hin, Aktin Nukleation in Zellen zu stimulieren, untersucht werden. Dazu wurden die GST-Fusionsproteine (GST-VCA, GST-VC, GST-CA, GST-V, GST-C, GST-A) in fünf bis sieben Tage alte primäre Makrophagen und konfluente p2-3 HUVEC (“Human Endothelial Vein Cells“) mikroinjiziert (Abb.3.9., A,B). Die errechnete Proteinkonzentration der Konstrukte in der Injektionskanüle betrug 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (ca. 100  $\mu\text{M}$ ). Dies führte zu einer geschätzten intrazellulären Konzentration des Proteins von ca. 2.5-10  $\mu\text{M}$ , bei einem Injektionsvolumen von 0.05-0.2 Picolitern. Die Zellen wurden 1 h nach der Injektion fixiert und Aktin-Filamente mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt. Zur Detektion der injizierten Zellen wurde jeweils Ratten IgG koinjiziert und später mit einem Antikörper angefärbt. So war eine Identifikation der injizierten Zellen im Mikroskop möglich. Wir untersuchten jeweils über 100 Zellen in drei unabhängigen Versuchen. Versuche mit primäre humane Makrophagen und HUVEC führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

Wie erwartet führte die Injektion des GST-VCA Konstruktes zu einem massiven Auftreten von Aggregationen aus Aktin-Filamenten im Zytoplasma der Zellen (Abb.3.9., C). Das Auftreten dieser Aktin-Aggregate zeigte ca. 1 h nach Injektion ein Maximum. Diese Klumpen waren im Durchmesser meist größer als 2  $\mu\text{m}$  und deshalb sicher von den makrophagenspezifischen Adhäsionsstrukturen, den Podosomen, zu unterscheiden (Linder *et al.*, 1999), die einen Durchmesser von 400 nm besitzen. Meist wurden die Podosomen parallel zum Auftreten massiver Aktin-Klumpen zerstört.

Mikroinjektion von GST oder GST-V zeigte auch bei hohen getesteten Konzentrationen (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und bei Nachinkubations-Zeiten bis zu 3 h keinen Effekt auf das Aktin-Zytoskelett der injizierten Zellen (Abb.3.9., C). Auch die Injektion von GST-A führte nicht zum Auftreten von Aktin-Aggregaten. Allerdings konnte GST-A, wenn es in einer hohen Konzentration injiziert wurde (6-10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), zur Auflösung der Podosomen in den injizierten Zellen führen.



**Abb.3.9. Die Mikroinjektion von primären humanen Makrophagen oder HUVEC mit GST-Fusionsproteinen der WASp C-terminalen Region kann F-Aktin-Aggregate im Zytoplasma auslösen**

(A,B) Konfokale Laser-Mikroskop Aufnahmen von fünf Tage alten, primären humanen Makrophagen (A) und p2 Generation konfluenten HUVEC (B), die mit GST-VC injiziert wurden. Polymerisiertes Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt. Kleine Bilder in (A) und (B) zeigen die injizierten Zellen, die durch Koinjektion von Ratten IgG und anschließendes Anfärben mit FITC anti-Ratten IgG Antikörper identifiziert wurden. Mikroinjektion von GST-VC führte zu einer starken Aktin-Verklumpung im Zytoplasma. Der Maßstab stellt 10  $\mu\text{m}$  dar. (C) zeigt die Prozentzahl der Zellen, die nach Mikroinjektion prominente Aktin-Klumpen im Zytoplasma aufwiesen. Das jeweils injizierte Konstrukt ist über dem Balken vermerkt. Der jeweilige Mittelwert ist mit Standardabweichung angegeben. GST-VCA:  $95.6 \pm 6.6\%$ , GST-VC:  $82.3 \pm 3.1\%$ , GST-CA:  $46.7 \pm 5.4\%$ , GST-V:  $0.0 \pm 0.0\%$ ; GST-C:  $17.7 \pm 6.3\%$ ; GST-A:  $0.0 \pm 0.0\%$ . Für jeden Wert wurden mindestens dreimal 30 Zellen ausgezählt. Es wurden nur Aktin-Aggregate mit einem Klumpendurchmesser von mehr als 2  $\mu\text{m}$  ausgewertet. Diese waren also klar von den Adhäsionsstrukturen primärer humaner Makrophagen, den Podosomen (Linder *et al.*, 1999) zu unterscheiden, die einen Durchmesser von ungefähr 400 nm besitzen. Zellen, die mindestens drei Aktin-Aggregate von mehr als 2  $\mu\text{m}$  Durchmesser oder mindestens ein Aggregat von 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufwiesen, wurden als positiv gewertet. In den meisten Fällen ging das Auftreten massiver Aktin-Klumpen mit einer Zerstörung der Podosomen einher.

GST-C war der kürzeste Abschnitt der VCA Domäne, der in der Lage war, die Verklumpung von Aktin-Filamenten zu verursachen. Das GST-C Konstrukt war dabei bei weitem weniger effektiv als das GST-VCA Konstrukt, aber in ca. 10% der injizierten Zellen konnte das

Auftreten von Aktin-Aggregaten im Zytoplasma beobachtet werden (Abb.3.9., C). Auch die kombinierte Injektion von GST-V oder GST-A, oder beider Konstrukte, mit GST-C vermochte den Effekt des GST-C Konstrukts nicht zu verstärken.

Wurde allerdings die V Region mit der C Region in einem Konstrukt exprimiert, GST-VC, so war dieses beinahe so effektiv wie das Vollängen GST-VCA Konstrukt bei der Induktion von intrazytoplasmatischen Aktin-Aggregaten (Abb.3.9., A,B,C). Auch GST-CA war effektiver als das GST-C Konstrukt, aber weniger potent als GST-VC (Abb.3.9., C). Die Aggregate, die durch die GST-CA und GST-C Konstrukte hervorgerufen wurden, waren diffuser als die der GST-VC und GST-VCA. Dieser Unterschied war klar zu erkennen, da zwei unabhängige Untersucher in einem Blindversuch 15 von 16 Zellen richtig als entweder GST-VC oder GST-CA injiziert identifizierten.

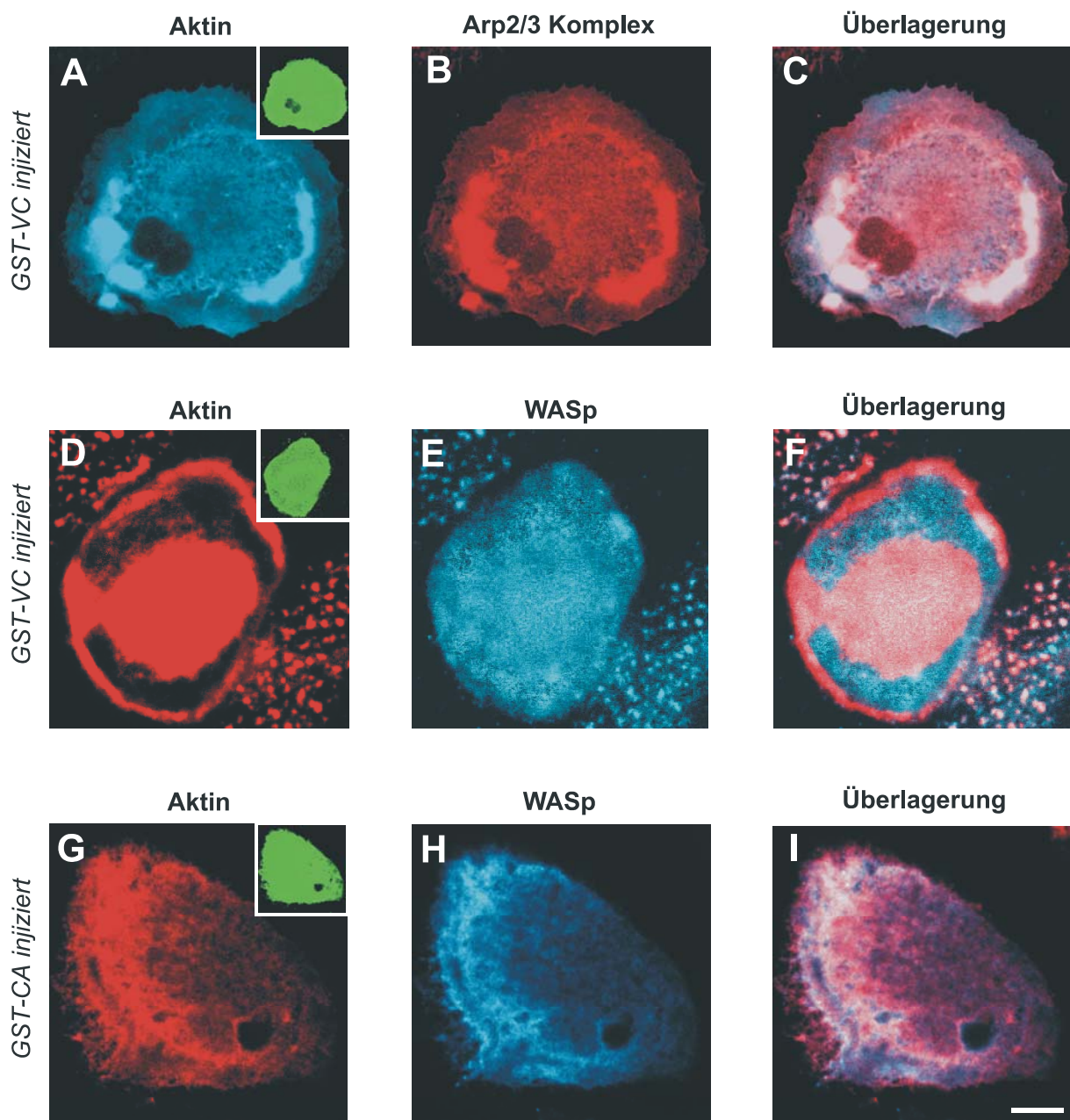
Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass alle GST-Fusionsproteine, die die C Region enthalten, in der Lage sind, Aktin-Akkumulation in Zellen auszulösen. Diese Fähigkeit wurde durch die Anwesenheit der A, V oder beider Regionen signifikant vergrößert. Diese Konstrukte mussten zur Stimulierung der Nukleation jedoch kovalent an die C Region gebunden sein.

### **3.2.9. GST-VC-induzierte Aktin-Klumpen kolokalisieren mit Arp2/3 Komplex aber nicht mit zellulärem WASp**

Die Ausbildung von Aktin-Netzen, wie sie in Lamellipodien von Fibroblasten oder in den Podosomen von Makrophagen gefunden werden, ist von der Aktivierung des Arp2/3 Komplexes abhängig (Machesky und Insall, 1998). Es gab allerdings zu Beginn der Arbeit Hinweise, dass in manchen Zellen auch Arp2/3 Komplex-unabhängige Wege der Nukleations-Regulation existieren (Sasaki *et al.*, 2000; Sagot *et al.*, 2002). Daher stellte sich insbesondere die Frage nach der Beteiligung von Arp2/3 Komplex bei der durch die verschiedenen WASp Teildomänen induzierten Aktin Nukleation. Die Lokalisation von Arp2/3 Komplex in injizierten Makrophagen wurde als Indikator für seine Beteiligung an der Erzeugung der beobachteten Aktin-Akkumulationen genutzt. Konfokale Laser-Mikroskopie zeigte, dass Arp2/3 Komplex mit den durch Injektion von GST-CA (nicht gezeigt) und GST-VC (Abb.3.10., A,B,C) hervorgerufenen Aktin-Klumpen kolokalisiert. Die Arp2/3 Komplex Färbung in den injizierten Zellen veranschaulicht, dass es zu einer Dislokation von der primär podosomalem Lokalisation, in einen mehr zytoplasmatischen Pool kommt. Zelluläres WASp,



das mit einem Antikörper dargestellt wurde, der gegen ein N-terminales Epitop gerichtet ist, zeigte keine signifikante Kolokalisation mit den GST-VC induzierten Aktin-Klumpen (Abb.3.10., D,E,F). WASp ließ sich allerdings in den mehr diffusen, durch GST-CA Injektion induzierten, Aktin-Aggregaten nachweisen (Abb.3.10., G,H,I). Die physiologische Lokalisation von WASp in den Podosomen der primären humanen Makrophagen kann in Abb.3.10. (E) in uninjizierten Zellen beobachtet werden. Die Lokalisation von WASp in uninjizierten Zellen diente gleichzeitig als Kontrolle für die Qualität der Färbung.



**Abb.3.10. Arp2/3 Komplex, nicht aber zellinternes WASp, kolokalisiert mit den durch Injektion von GST-VC erzeugten Aktin-Klumpen**

(A-C) Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von fünf Tage alten Makrophagen, die mit GST-VC injiziert wurden. Aktin wurde mit monoklonalem anti-Aktin Antikörper angefärbt (blau) (A), Arp2/3 Komplex mit anti-

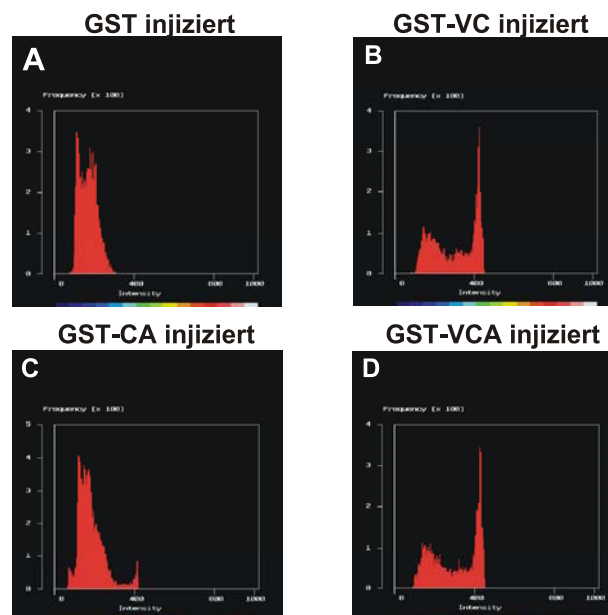


ARPC1 Antikörper (gegen die p41 Untereinheit von Arp2/3 Komplex) (rot) (B), (C) ist eine digitale Überlagerung der Bilder aus (A) und (B), wobei rosa eine Kollokalisierung anzeigt. (D-I) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von fünf Tage alten Makrophagen, die mit GST-VC (D-F) oder GST-CA (G-I) injiziert wurden. Angefärbt wurde polymerisiertes Aktin mit Alexa-568 Phalloidin (D,G) (rot), zelluläres WASp wurde mit anti-WASp Antikörper dargestellt (E,H) (blau). (F,I) stellen jeweils die Überlagerung von (D) und (E) bzw. (G) und (H) dar. In den uninjizierten Zellen (Rand von D,E,F) zeigte sich eine Kollokalisierung von WASp und Aktin in den Podosomen. WASp war in den GST-VC injizierten Zellen diffus im Zytoplasma verteilt (E), während es in den durch GST-CA injizierten Aggregaten deutlich akkumulierte (H). Die kleinen Bilder in (A,D,G) zeigen die injizierten Zellen, bei denen als Injektionsmarker Ratten IgG angefärbt wurde. Der weiße Maßstab entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Mikroinjektion von GST-VC, GST-CA (beide 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und GST-A (6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) führte zu einer Auflösung von Podosomen. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen (Linder *et al.*, 1999). GST-C Injektion führte nur in weniger als 10% der Zellen zu einer Auflösung von Podosomen. Meist war das Verschwinden der Podosomen mit dem Auftreten von Aktin-Aggregaten assoziiert. GST-V führte zu keiner Podosomen-Zerstörung.

### 3.2.10. Veränderung der Netto-Polymerisation von Aktin durch Injektion von GST-VC

Um zu überprüfen, ob durch die Injektion von GST-VCA, GST-VC oder GST-CA der zelluläre Gehalt an polymerisiertem Aktin verändert wird, bestimmten wir die Menge an intrazytoplasmatischem, polymerisiertem Aktin anhand der Alexa-568 Phalloidin Fluoreszenz (Abb.3.11.).

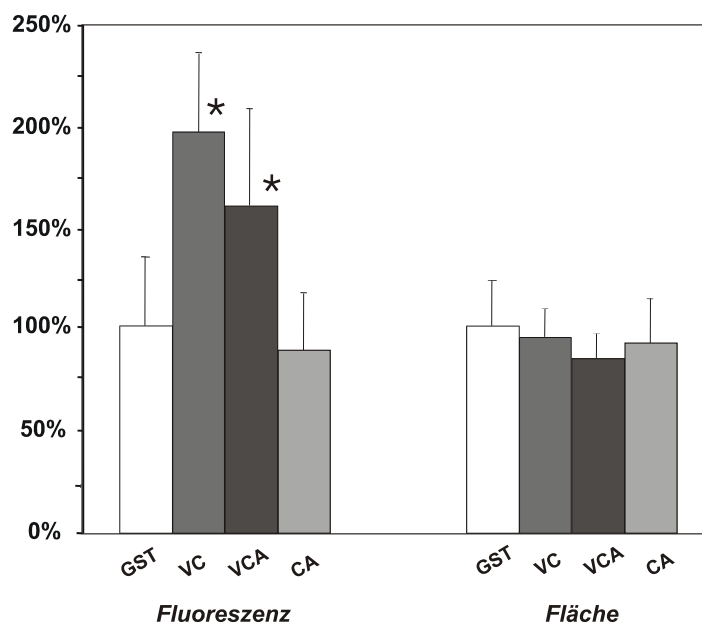


**Abb.3.11. Fluoreszenzprofile von GST, GST-VCA, GST-VC und GST-CA injizierten Zellen**

Fluoreszenzprofile je einer einzelnen, repräsentativen Zelle der in Abb.3.12. aufgeführten Grundgesamtheit. Jeder Balken bezeichnet die Anzahl der Pixel (x-Achse), die eine bestimmte Intensität zeigen (y-Achse). Die Profile des GST-CA Konstruktes (C) und von GST (A) alleine unterscheiden sich kaum. Sie zeigen eine einzige

Intensitätsspitze. Die Profile von GST-VC (B) und GST-VCA (D) zeigen ein weiteres Maximum starker Intensität, das die Fluoreszenz der Klumpen charakterisiert.

Die Menge an polymerisiertem Aktin in GST-injizierten Zellen, welche nach der Injektion keine Aktin-Klumpen aufwiesen, wurde als 100% gesetzt. Alle weiteren Zellen, die vermessen wurden, enthielten Aktin-Klumpen. GST-VCA und GST-VC injizierte Zellen enthielten signifikant mehr polymerisiertes Aktin (164% bzw. 197%) als die Kontrollzellen. Der F-Aktin Gehalt in den GST-CA injizierten Zellen nahm leicht ab (85%) (Abb.3.12.).



**Abb.3.12. Mikroinjektion von GST-VCA und GST-VC aber nicht GST-CA erhöht den zellulären Gehalt an polymerisiertem Aktin**

Balken links: Epifluoreszenz des Alexa-568 Phalloidin markierten intrazellulären, polymerisierten Aktin nach Mikroinjektion der Zellen mit einem entsprechenden Konstrukt. Werte sind als Mittelwerte in %  $\pm$  einer Standardabweichung angegeben. Die Werte bezeichnen die Pixelintensität einzelner injizierter Zellen. GST:  $100 \pm 38\%$ , GST-VCA:  $164 \pm 45\%$ , GST-VC:  $197 \pm 42\%$ , GST-CA:  $85 \pm 37\%$ . Balken rechts: aufgetragen ist die Fläche der injizierten Makrophagen. Werte sind als Mittelwerte in %  $\pm$  einer Standardabweichung angegeben. Die Werte bezeichnen die Fläche in  $\mu\text{m}^2$  einzelner injizierter Zellen. GST:  $100 \pm 24\%$ , GST-VCA:  $80 \pm 16\%$ , GST-VC:  $94 \pm 16\%$ , GST-CA:  $92 \pm 25\%$ . Unter jedem Balken ist das jeweilige Konstrukt angegeben. Für jeden Wert wurden 30 Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt injiziert und ausgewertet. Das Sternsymbol zeigt solche Werte an, die sich von GST-injizierten Zellen im Student-T-Test mit zweiseitigem p-Wert signifikant unterschieden (p kleiner 0.05).

### Zusammenfassung

- WASp GST-VC weist in Anisotropie Messungen keine Arp2/3 Komplex Bindung auf
- GST-VC aktiviert die Arp2/3 Komplex-abhängige Aktin Nukleation *in vitro*
- GST-VC kann in *in vitro* Versuchen die Ausbildung von Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin-Filament Verzweigungen induzieren
- GST-VC induziert Aktin-Aggregate nach Mikroinjektion in Zellen, die Aggregate sind auf eine Zunahme des intrazellulären polymerisierten Aktins zurückzuführen

**GST-VC ist das minimal notwendige WASp Konstrukt für die Arp2/3 Komplex Aktivierung *in vitro* und in Zellen. Die A Region, von der man bisher gedacht hatte dass sie für diese Funktionen unabdingbar ist, ist weder für die Arp2/3 Komplex Aktivierung noch für die Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen essentiell.**

## 3.3. Die Rolle der WASp-A Region bei der Regulation der Aktin Nukleation

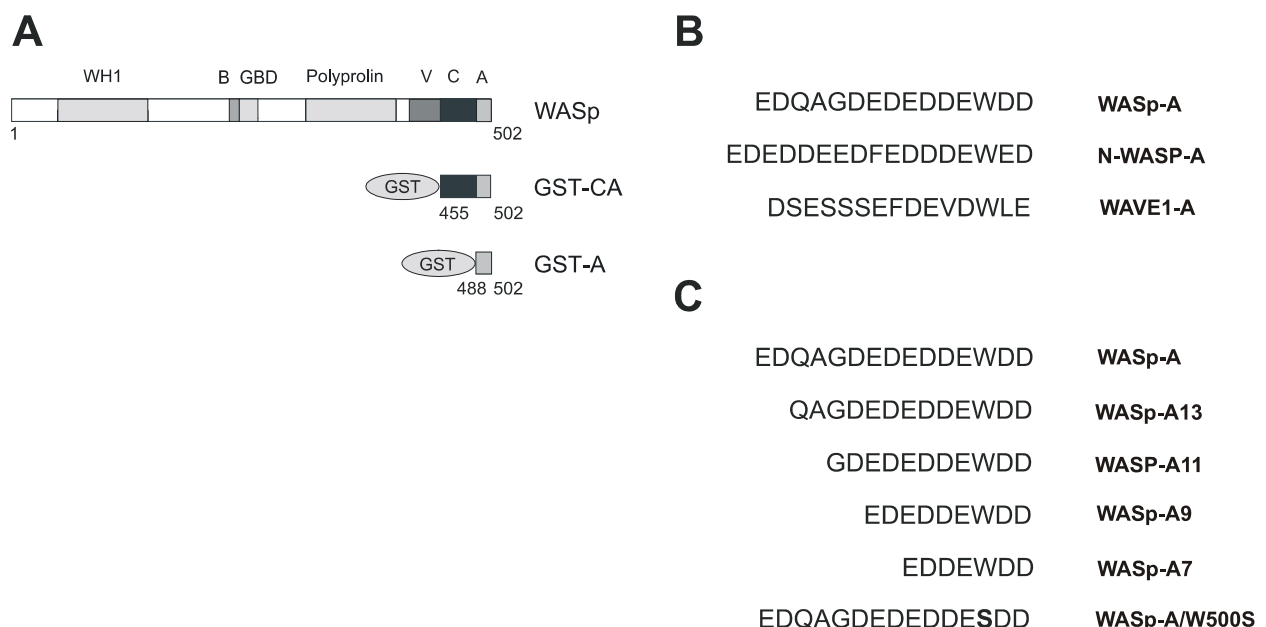
### 3.3.1. Eigenschaften und Funktionen der A Region

Die A Region stellt bei allen bisher beschriebenen WASp-Familie Proteinen eine hochaffine Bindestelle für den Arp2/3 Komplex dar. Bis jetzt war davon ausgegangen worden, dass diese Bindung unabhängig von einer Aktivierung ist (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999). Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, ist die A Region für die Regulierung der Aktin Nukleation durch WASp nicht essentiell. Deshalb sollte untersucht werden, welche weiteren Funktionen, neben der Arp2/3 Komplex Bindung, der A Region verschiedener WASp-Familie Proteinen zukommen.

Es ist bekannt, dass Bindung der WASp-VCA Region an den im Basalzustand inaktiven Arp2/3 Komplex zu seiner Aktivierung führt (Übersicht in Mullins, 2000). In einer neueren Arbeit wurde darauf hingewiesen, dass Arp2/3 Komplex möglicherweise in verschiedenen Zwischenstufen aktiviert wird und nicht immer direkt vom inaktiven in den aktiven Zustand überführt wird (Marchand *et al.*, 2001).

### 3.3.2. WASp-A, N-WASP-A und WAVE-A Konstrukte und ihre Arp2/3 Komplex Bindung

Zur genaueren Charakterisierung der A Regionen verschiedener WASp-Familie Proteinen wurden Konstrukte der Sauren Region von WASp, N-WASP und WAVE kloniert. Die A Region (AS 488-502) von WASp besteht aus 15 Aminosäuren. Eine entsprechende Region ist bei allen Proteinen vorhanden, die Arp2/3 Komplex binden (Übersicht bei Higgs und Pollard, 1999; Welch und Mullins, 2002). Zwischen der A Region von WASp und N-WASP besteht eine sehr hohe Homologie (11 identische Aminosäuren von 15), die zu WAVE-A ist um einiges geringer (sieben identische Aminosäuren zwischen WASp-A und WAVE-A) (Abb.3.13., B). Um die Bedeutung der WASp-A Region näher zu untersuchen, und die Aminosäuren zu identifizieren, die für eine Interaktion mit Arp2/3 Komplex notwendig waren, wurden N-terminal trunkierte Konstrukte von 15, 13, 11, 9 und 7 Aminosäuren hergestellt. Weiterhin wurde eine Mutante der WASp-A Region kloniert, bei der die für die Arp2/3 Komplex Bindung wichtige Aminosäure Tryptophan an Position 500 zu Serin mutiert worden war (Abb.3.13., C). Dadurch wollten wir die Affinität des Konstruktes für Arp2/3 Komplex drastisch reduzieren, wie dies bereits für die VCA Region von WASp gezeigt worden war (Marchand *et al.*, 2001).



**Abb.3.13. GST-Fusionskonstrukte der WASp C-terminalen Region und Vergleich der Aminosäure Region von WASp-Familie Proteinen**

(A) Domänenstruktur von WASp: WASp Homologie1 Domäne (WH1), Basische Region (B), GTPasen-Bindungs Domäne (GBD), Polyprolin Domäne, WH2/Verprolin-homologe Domäne (V), Zentrale Region (C) und eine Sequenz von sauren Aminosäuren (A) (Übersicht bei Higgs und Pollard, 2001). Die Zahlen bezeichnen

die jeweils erste und letzte Aminosäure des Proteins, die in dieser Untersuchung als GST-Fusionsprotein verwendet wurden. (B) Vergleich der Sauren Region von WASp, N-WASP und WAVE1. (C) Trunkierte oder mutierte Konstrukte der WASp-A Region, die für diese Studie verwendet wurden. Bei dem W500S Konstrukt handelt es sich um die WASp-A Region bei der die für die Arp2/3 Komplex Bindung wichtige Aminosäure W 500 zu S mutiert wurde.

Zuerst wurde die Fähigkeit dieser Konstrukte, Arp2/3 Komplex aus Makrophagenlysaten zu binden, untersucht (Abb.3.14., A,B). WASp GST-A war in der Lage Arp2/3 Komplex zu binden. Die kürzeren Konstrukte der WASp-A Region banden Arp2/3 Komplex mit abnehmender Stärke. WASp-A11 konnte nur sehr wenig Arp2/3 Komplex aus Makrophagenlysaten binden, während WASp-A7 in diesem Versuchsaufbau keine Interaktion zeigte (Abb.3.14., A). Die abnehmende Fähigkeit der Konstrukte WASp im GST-“Pulldown Assay“ zu pelletieren wurde durch eine abnehmende Bindungsaffinität für Arp2/3 Komplex in der Anisotropie bestätigt. So band GST-A von WASp Arp2/3 Komplex mit einer  $K_d$  von 1  $\mu\text{M}$  (Abb.3.14., C), während WASp-A9 dies nur noch mit einer  $K_d$  von 4  $\mu\text{M}$  tat (Abb.3.14., D). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle in den “Pulldown Assays“ diente das WASp GST-CA Konstrukt (Abb.3.13., A), welches alle für die Arp2/3 Komplex wichtigen Bindungsstellen enthält, sowie WASp-A/W500S (Abb.3.13., C), bei dem die Bindungsaffinität für Arp2/3 Komplex drastisch eingeschränkt war.

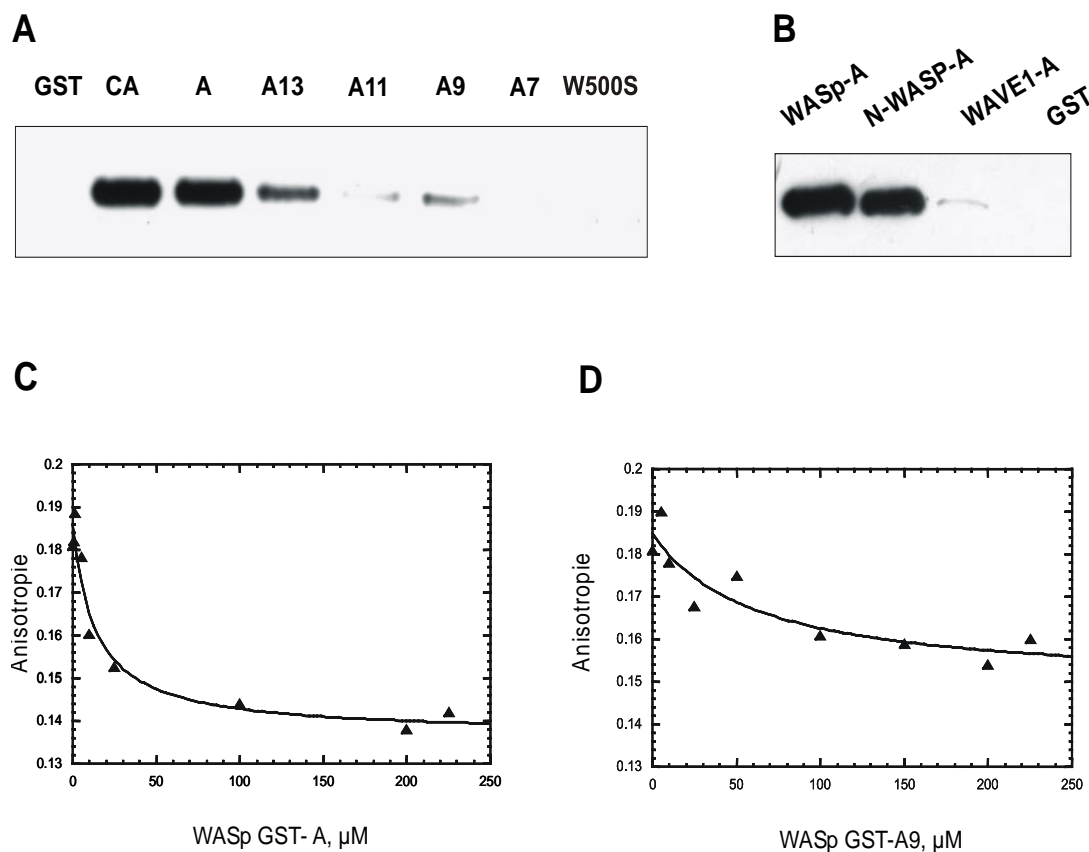


Abb.3.14. Arp2/3 Komplex Bindung der GST-Fusionsproteine von WASp und WASp-Familie Proteinen

(A,B) Western Blots von GST-“Pulldown“ Versuchen, in denen in (A) eine Auswahl von N-terminal trunkeerten Peptiden der WASp-A Region verwendet wurden. In (B) wurden GST-Fusionskonstrukte von WASp-Familie Proteinen verwendet. Die Blots wurden mit anti-ARPC1 Antikörper inkubiert, um die Arp2/3 Komplex Bindung darzustellen. Bezeichnungen der benutzten Polypeptide sind über den jeweiligen Spalten angegeben. GST diente als Negativkontrolle. (C,D) zeigt Anisotropie Messungen für die Bindung von WASp-A (C) und WASp-A9 (D) an Arp2/3 Komplex. Dabei kompetitierte GST-freie Rhodamin-VCA mit den angegebenen Konstrukten um eine Bindung an Arp2/3 Komplex. Eine Abnahme der Anisotropie zeigt eine Bindung durch das kompetitierende Konstrukt an. WASp GST-A band Arp2/3 Komplex mit einer Dissoziationsequilibriums-Konstanten  $K_d$  von 1  $\mu$ M, WASp GST-A9 mit einer  $K_d$  von 4  $\mu$ M.

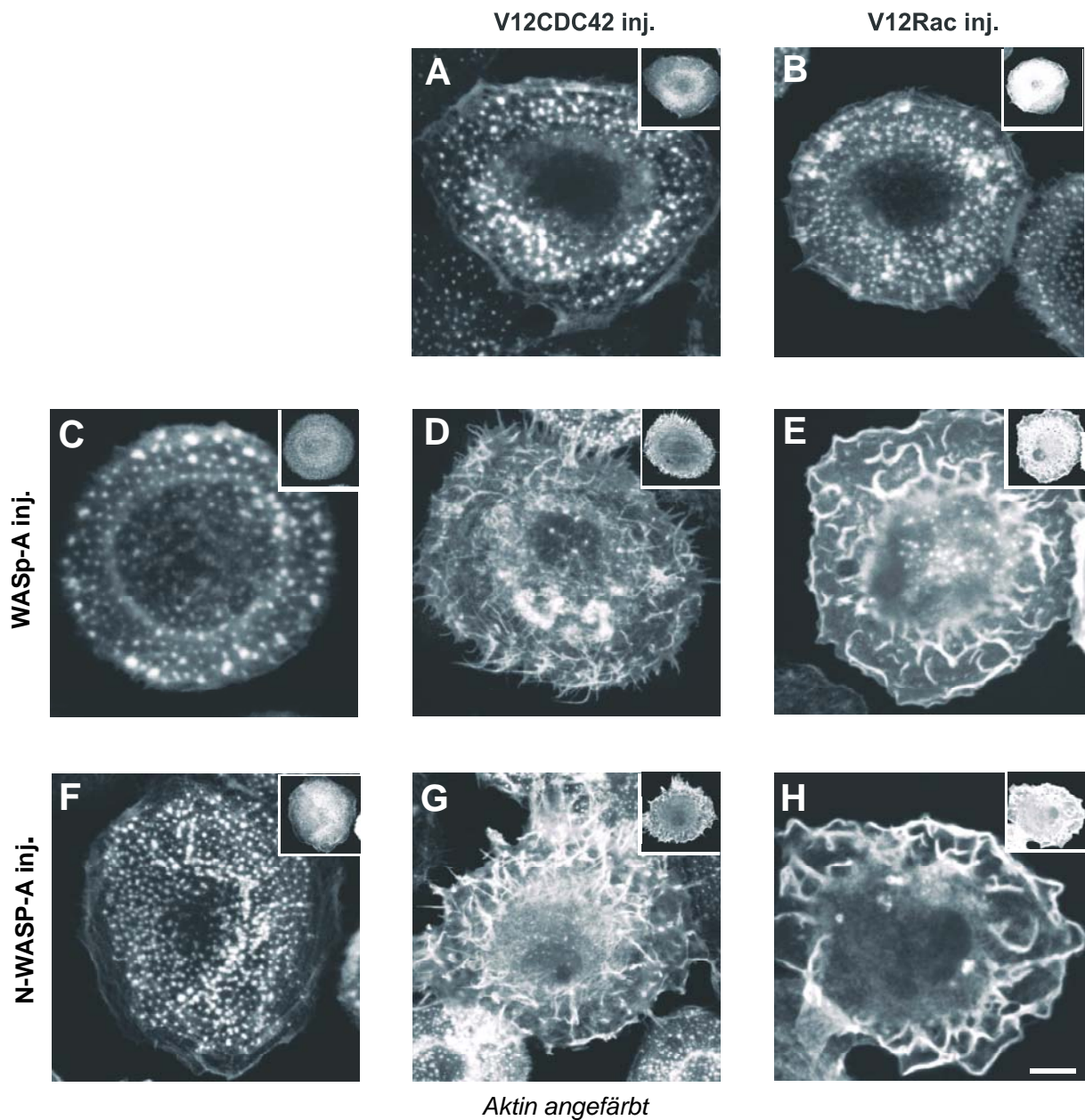
Ein GST-Fusionsprotein der N-WASP-A Region zeigte eine der WASp-A vergleichbare Arp2/3 Komplex Bindung aus Makophagenlysaten (Abb.3.14., B), während ein Konstrukt der WAVE-A Region dazu kaum in der Lage war (Abb.3.14., B).

### 3.3.3. Zelluläre Effekte der GST-A Konstrukte bei Koinjektion mit aktiven GTPasen

Weiterhin wollten wir untersuchen, ob die Ausbildung spezifischer Aktin-Strukturen wie “Ruffles“ oder Filopodien durch die A Region von WASp-Familie Proteinen beeinflusst wird. Mikroinjektion von primären humanen Makrophagen mit einer konstitutiv aktiven GTPase Mutante, V12CDC42 (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) oder V12Rac (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l), führt zur Ausbildung von Filopodien bzw. Lamellipodien und “Ruffles“ (Linder *et al.*, 1999; Linder *et al.*, unveröffentlichte Beobachtungen). Die Ausbildung von “Ruffles“ oder Lamellipodien ging meist mit einer Zell-Ausbreitung einher.

Wurden die GTPasen in subaktiven Konzentrationen injiziert, so kam es zu keinem erkennbaren Effekt auf das Aktin-Zytoskelett (Injektion von V12CDC42 (0.1  $\mu$ g/ml), V12Rac (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)) (Abb.3.15., A,B). Auch Injektion von WASp-A oder N-WASP-A in einer Konzentration von 4  $\mu$ g/ $\mu$ l (Abb.3.15., C,F) führte zu keinem detektierbaren Effekt auf das Aktin-Zytoskelett (Filopodien-Bildung: WASp-A,  $12 \pm 2\%$ ; N-WASP-A,  $12 \pm 4\%$ ; WAVE1-A,  $12 \pm 7\%$ ; V12CDC42,  $10 \pm 9\%$ ; “Ruffle“-Bildung: WASp-A,  $0 \pm 0\%$ ; N-WASP-A,  $0 \pm 0\%$ ; WAVE1-A,  $8 \pm 4\%$ ; V12Rac,  $3 \pm 3\%$ ) (Abb.13.16.). Injizierte man jedoch die WASp-A oder N-WASP-A Region zusammen mit einer konstitutiv aktiven GSTase, alle in subaktiven Konzentrationen, so kam es zu einer dramatischen Steigerung der Filopodien- bzw. “Ruffle“-Bildung (Abb.3.15., D,E,G,H). Der entsprechende Phänotyp war abhängig von der jeweiligen GTPase: Koinjektion mit V12CDC42 führte zur Ausbildung von Filopodien (Filopodien-Bildung: V12CDC42 + WASp-A,  $97 \pm 6\%$ ; V12CDC42 + N-WASP-A,  $96 \pm 4\%$ ) (Abb.3.16.), während Koinjektion von V12Rac zur Bildung von “Ruffles“ und Zell-

Ausbreitung führte (‘‘Ruffle’’-Bildung: V12Rac + WASp-A,  $91 \pm 2\%$ ; V12Rac + N-WASP-A,  $94 \pm 5\%$ ) (Abb.3.16.). In dieser Hinsicht waren die A Regionen von WASp und N-WASP austauschbar.



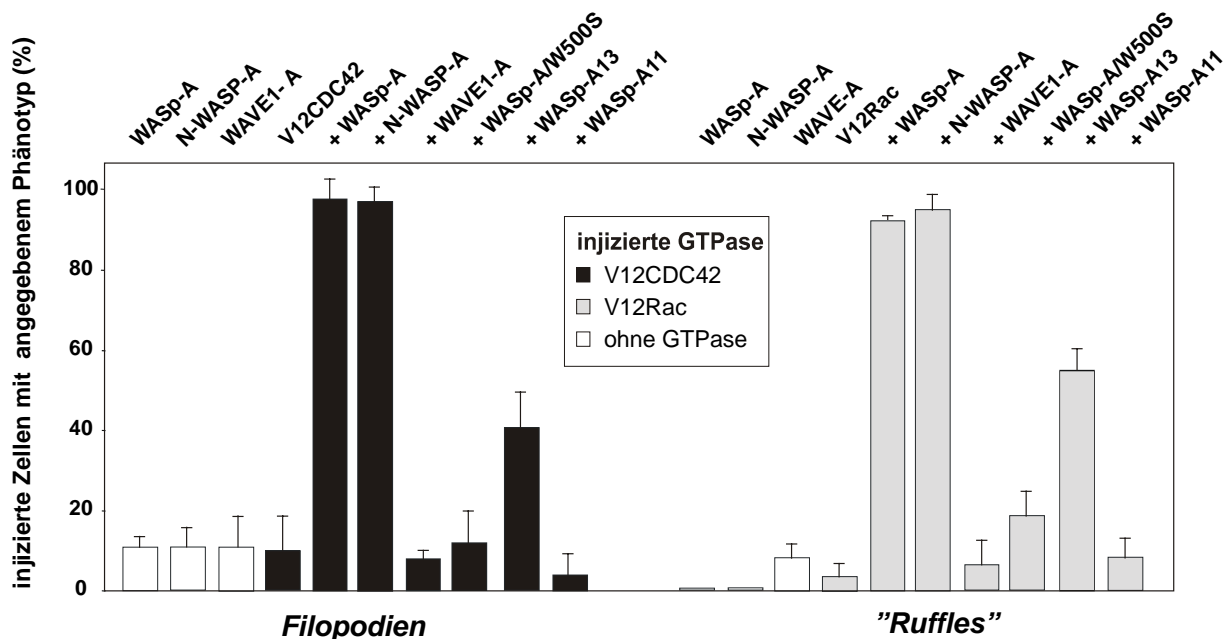
**Abb.3.15. Koinjektion von WASp- oder N-WASP-A mit konstitutiv aktiven GTPase Mutanten hat einen synergistischen Effekt auf die Bildung von Filopodien und Lamellipodien**

(A-H) Konfokale Laser-Mikroskop Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, in denen F-Aktin mit Alexa 568-Phalloidin 1 h nach der Injektion angefärbt wurde. Die kleinen Bilder zeigen jeweils Färbung von Ratten IgG, das als Injektionsmarker koinjiziert wurde. V12CDC42 (A) und V12Rac (B) wurde in einer Konzentration von  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  injiziert. WASp-A (C) und N-WASP-A (F) in einer Konzentration von  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Bei Einsatz der beschriebenen Konzentrationen zeigte sich nach der Injektion kein erkennbarer Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett. Koinjektion von V12CDC42 mit WASp-A (D) oder N-WASP-A (G) führte bei unveränderten Konzentrationen zur Ausbildung von Filopodien, während die Koinjektion von V12Rac mit WASp-A (E) oder N-WASP-A (H) zur ‘‘Ruffle’’-Bildung und Zell-Ausbreitung führte. Der weiße Maßstab beträgt  $12 \mu\text{m}$  für (E,H) und  $10 \mu\text{m}$  für alle anderen Bilder.



Im Gegensatz dazu zeigte die Koinjektion der aktiven GTPase Mutanten mit der A Region von WAVE keinen Einfluss auf das Zytoskelett (Filopodien-Bildung: V12CDC42 + WAVE1-A,  $8 \pm 2\%$ ; "Ruffle"-Bildung: V12Rac + WAVE1-A,  $6 \pm 7\%$ ) (Abb.3.16.). Auch WASp-A13 war in der Lage, die Bildung von Filopodien oder "Ruffles" in den Koinjektionsversuchen zu unterstützen, obwohl sie dabei weniger effektiv als die GST-A von WASp war. Kürzere Konstrukte zeigten diesen Effekt nicht mehr (Filopodien-Bildung: V12CDC42 + WASp-A13,  $41 \pm 10\%$ ; V12CDC42 + WASp-A11,  $3 \pm 6\%$ ; "Ruffle"-Bildung: V12Rac + WASp-A13,  $53 \pm 7\%$ ; V12Rac + WASp-A11,  $8 \pm 5\%$ ) (Abb.3.16.)

Koinjektion der GTPasen Konstrukte mit der WASp-A/W500S führte zu einer starken Reduzierung der Filopodien (Filopodien-Bildung: V12CDC42 + WASp-A/W500S,  $12 \pm 8\%$ ; Abb.3.16.) und "Ruffle"-Bildung ("Ruffle"-Bildung: V12Rac + WASp-A/W500S,  $19 \pm 5\%$ ) (Abb.3.16.) im Vergleich zu den Koinjektionsversuchen mit WASp-A. WASp-CA war in Koinjektionsexperimenten in der Lage, die Ausbildung von Filopodien oder "Ruffles" schon bei einer Konzentration von  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  zu induzieren (nicht gezeigt). Dies korreliert gut mit der 10-mal stärkeren Affinität des GST-CA Konstruktes für Arp2/3 Komplex ( $0.1 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu GST-A ( $1 \mu\text{M}$ ).



**Abb.3.16. Evaluierung der Bildung von Aktin-Strukturen in primären humanen Makrophagen nach Mikroinjektion mit WASp-Familie Proteinen A Konstrukten und/oder konstitutiv aktiven GTPasen**

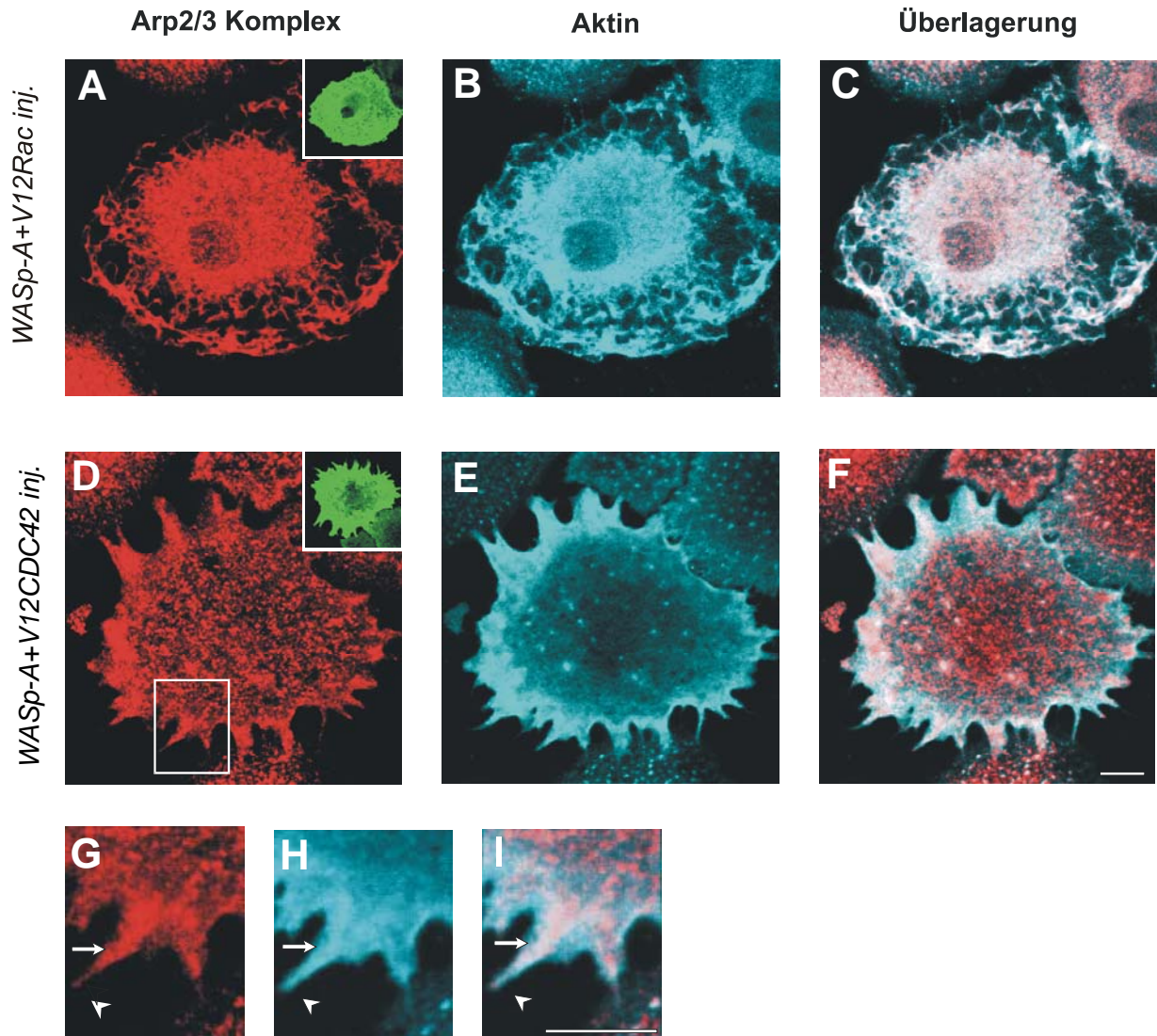
Weißer Säulen: Injektion eines WASp-Familie Protein Konstrukts ohne GTPase Mutanten, schwarze Säulen: Injektion von V12CDC42 ( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), graue Säulen: Injektion von V12Rac ( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). "+" bezeichnet die Koinjektion mit dem entsprechenden WASp-Familie Protein A Konstrukt ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die Bezeichnungen der mikroinjizierten Polypeptide sind über jeder Säule angegeben. Werte für die Zellen, die einen bestimmten Aktin Phänotyp zeigten, sind als Mittelwerte in % ± Standardabweichung angegeben. Filopodien-Bildung: WASp-A,  $12 \pm 2\%$ ; N-WASP-A,  $12 \pm 4\%$ ; WAVE1-A,  $12 \pm 7\%$ ; V12CDC42,  $10 \pm 9\%$ ; V12CDC42 + WASp-A,  $97 \pm 6\%$ ;



V12CDC42 + N-WASP-A,  $96 \pm 4\%$ ; V12CDC42 + WAVE1-A,  $8 \pm 2\%$ ; V12CDC42 + WASp-A/W500S,  $12 \pm 8\%$ ; V12CDC42 + WASp-A13,  $41 \pm 10\%$ ; V12CDC42 + WASp-A11,  $3 \pm 6\%$ . "Ruffle"-Bildung: WASp-A,  $0 \pm 0\%$ ; N-WASP-A,  $0 \pm 0\%$ ; WAVE1-A,  $8 \pm 4\%$ ; V12Rac,  $3 \pm 3\%$ ; V12Rac + WASp-A,  $91 \pm 2\%$ ; V12Rac + N-WASP-A,  $94 \pm 5\%$ ; V12Rac + WAVE1-A,  $6 \pm 7\%$ ; V12Rac + WASp-A/W500S,  $19 \pm 5\%$ ; V12Rac + WASp-A13,  $53 \pm 7\%$ ; V12Rac + WASp-A11,  $8 \pm 5\%$ . Für jeden Wert wurden dreimal 30 injizierte Zellen in unabhängigen Versuchen evaluiert.

### **3.3.4. Beteiligung von Arp2/3 Komplex bei der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien in primären humanen Makrophagen**

Konstrukte der A Region von WASp-Familie Proteinen können also bei der Induktion von Aktin-Strukturen in Zellen mitwirken. Diese Funktion schien stark mit ihrer Fähigkeit Arp2/3 Komplex zu binden zu korrelieren. Wir wollten deshalb überprüfen, ob Arp2/3 Komplex auch in die induzierten Strukturen rekrutiert wird. Dazu wurden die zuvor beschriebenen Koinjektionsexperimente mit aktiven GTPase Mutanten und dem WASp GST-A Konstrukt durchgeführt. Tatsächlich zeigte sich eine deutliche Kolo-kalisation von Arp2/3 Komplex und Aktin in den durch Koinjektion von V12Rac und WASp-A induzierten "Ruffles" (Abb.3.17., A,B,C). Auch in den durch WASp-A und V12CDC42 induzierten Filopodien fand sich ein Akkumulation von Arp2/3 Komplex (Abb.3.17., D,E,F). Eine entsprechende Detail-Vergrößerung (Abb.3.17., G,H,I) macht deutlich, dass Arp2/3 Komplex dabei stark an der Basis der induzierten Filopodien akkumulierte, die Spitzen des Filopodiums aber eine deutlich schwächere Arp2/3 Komplex Färbung aufwiesen.



**Abb.3.17. Arp2/3 Komplex ist in Aktin-Strukturen lokalisiert, die durch Injektion von Konstrukten der WASp-A Region und konstitutiv aktiven GTPase Mutanten entstanden sind**

Konfokale Laser-Mikroskop Aufnahmen von sieben Tage alten Makrophagen, die mit V12Rac + WASp-A (A,B,C) oder V12CDC42 + WASp-A (D-I) injiziert wurden. Die Abbildungen entstanden durch digitale Überlagerung von drei (A-C) oder zwei (D-I) Schnitten des Laser-Mikroskops, die sich im Abstand von 1-2  $\mu\text{m}$  zueinander befanden. Rote Färbung: Arp2/3 Komplex wurde mit anti-ARPC2 Antikörper gefärbt (A,D,G), blaue Färbung: Aktin wurde mit anti-Aktin Antikörper gefärbt (B,E,H). Überlagerung von (A) und (B) in (C), (D) und (E) in (F), und (G) und (H) in (I). Rosa Farbe zeigt Kolo-kalisation an. Die kleinen Bilder in (A,D) zeigen die Anfärbung von Ratten IgG, das als Injektionsmarker verwendet wurde. (G,H,I) ist ein Ausschnitt aus (D,E,F, der weiße Rahmen in (D) bezeichnet den Ausschnitt zur besseren Übersicht). Der weiße Pfeil zeigt auf die Basis eines Filopodiums, in der sich F-Aktin und Arp2/3 Komplex nachweisen ließen. Die Pfeilspitze zeigt auf die Spitze eines Filopodiums, die eine Akkumulation von F-Aktin, nicht aber von Arp2/3 Komplex zeigte. Der weiße Maßstab beträgt für alle Bilder gleicher Größe 10  $\mu\text{m}$ .

### **Zusammenfassung**

- WASp-A und N-WASP-A binden Arp2/3 Komplex, WAVE-A ist dafür nicht ausreichend
- Die vier N-terminalen sauren Aminosäuren sowie ein Tryptophan an Position 500 sind notwendig für die Arp2/3 Komplex Bindung durch WASp-A
- Koinjektion von WASp-A oder N-WASP-A mit konstitutiv aktiven GTPasen führt zur synergistischen Ausbildung von Filopodien oder “Ruffles“

**Wir postulieren, dass die WASp-A Region einen “Priming“- (Aktivierungs-) Schritt am Arp2/3 Komplex auslöst, so dass dieser empfänglicher für aktivierende Signale wird.**

## **3.4. Regulation der Aktin Nukleation *in vivo* - die Podosomen**

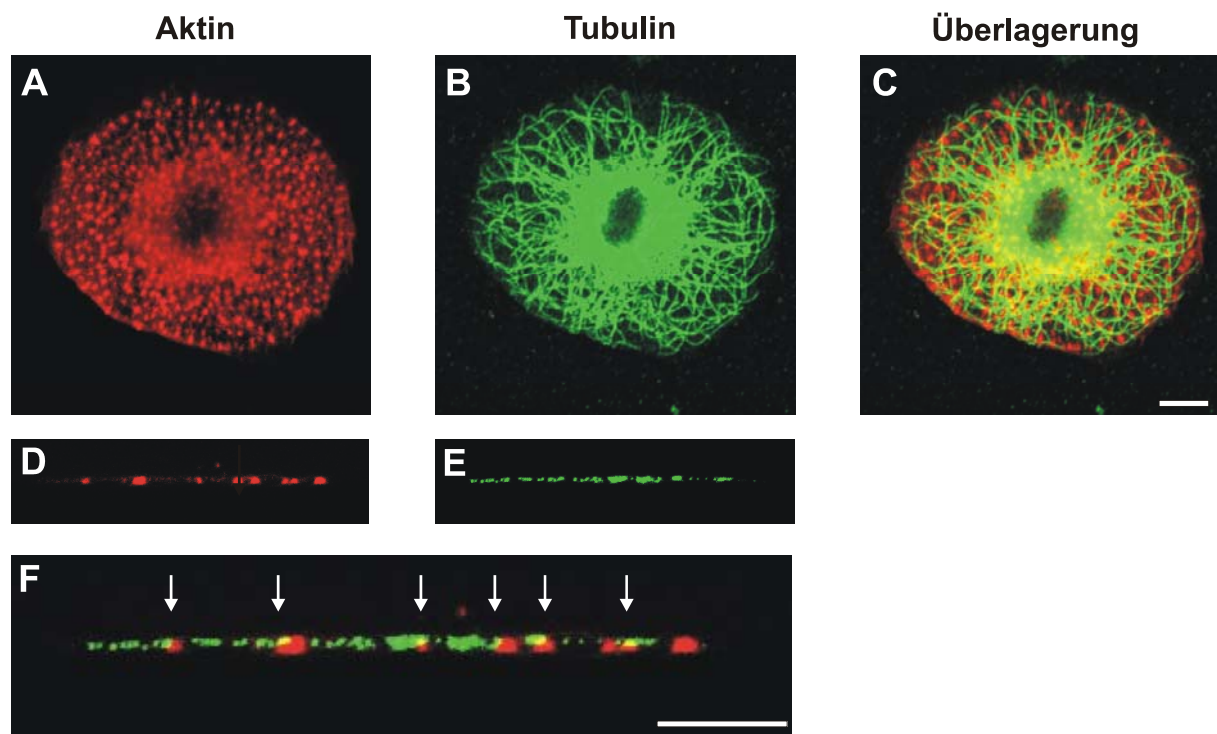
### **3.4.1. Aktin- und Tubulin-Zytoskelett zeigen in primären humanen Makrophagen eine räumliche Nähe**

Podosomen sind die prominentesten Aktin-Strukturen des Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen. Diese einzigartigen Adhäsionsstrukturen werden durch CDC42, WASp und Arp2/3 Komplex reguliert (Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001). Sie eignen sich deshalb als Modell zur Untersuchung der WASp- und Arp2/3 Komplex-abhängigen Signalwege.

Erst in jüngerer Zeit wurde erkannt, dass die verschiedenen Zytoskelett-Bestandteile, wie Aktin und Mikrotubuli, nicht unabhängig voneinander existieren, sondern eine Vielfalt bisher sehr unvollständig untersuchter Interaktionen bestehen (Goode *et al.*, 2000; Kaverina *et al.*, 1998; Kaverina *et al.*, 1999). Da Podosomen Orte starker F-Aktin-Akkumulation darstellen, sollte untersucht werden, ob in diesen definierten Strukturen eine Interaktion mit dem Tubulin-Zytoskelett stattfindet.

Um die räumlichen Beziehungen der verschiedenen Zytoskelett-Anteile zueinander zu untersuchen, wurden zuerst einige Immunfluoreszenz-Markierungen in humanen Makrophagen durchgeführt. Dabei zeigte sich, wie bereits beschrieben, dass das Aktin-Zytoskelett in ruhenden, fünf bis sieben Tage alten Zellen, vor allem durch einen in der Zellperipherie gelegenen Ring von aktinreichen Podosomen gekennzeichnet ist (Linder *et al.*, 1999) (Abb.3.18., A). Diese befinden sich nur auf der Ventralseite der Zelle. Das Tubulin-Zytoskelett scheint, wie in anderen Zellen auch, radiär von einem Punkt in Kernnähe

auszugehen (MTOC, Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) und bis weit in die Zellperipherie zu reichen (Abb.3.18., B). Durch sequentielle Schnittanalyse im konfokalen Laser-Mikroskop konnte festgestellt werden, dass die Mikrotubuli (+) Enden vor allem in der unteren, ventralseitigen Zellregionen zu finden sind, in der sich auch die aktinhaltigen Podosomen befinden (Abb.3.18., D,E). Im xz Schnitt (dies entspricht einem optischen Vertikalschnitt) schienen zudem einige Mikrotubuli Podosomen direkt zu kontaktieren, was durch die gelbe Farbe (Abb.3.18., F, Überlagerung aus rot und grün) angezeigt wird.



**Abb.3.18. Räumliche Organisation des Aktin- und Tubulin-Zytoskelett in primären humanen Makrophagen**

Angefärbt wurden sechs Tage alte Zellen. Konfokale Laser-Mikroskop Aufnahmen, die horizontale Zellschnitte von ventralen Zellregionen (A-C) oder vertikale Schnittebenen von peripher gelegenen Zellregionen (D-F) zeigen. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin (A,D), rote Farbe, dargestellt, Tubulin mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper, grüne Farbe (B,E). Digitale Überlagerungen von (A) und (B) in (C) und (D) und (E) in (F). Gelbe Farbe in den Überlagerungsbildern zeigt Kolokalisation an. Die Mikrotubuli scheinen in enger räumlicher Nachbarschaft mit den Podosomen zu liegen und diese mitunter auch direkt zu berühren (das MTOC ist in (B) nicht in den dargestellten Ebenen angeschnitten und deshalb nicht sichtbar). Der weiße Maßstab ist jeweils 10  $\mu$ m für (A-E) bzw. für (F).

Die zentralen Zellanteile, sowie spontan auftretende podosomenfreie Areale, waren meist auch frei von Mikrotubuli Enden. Bezogen auf die Gesamtgröße eines Makrophagen, ist es bemerkenswert, dass sowohl Podosomen als auch Mikrotubuli Enden in einem

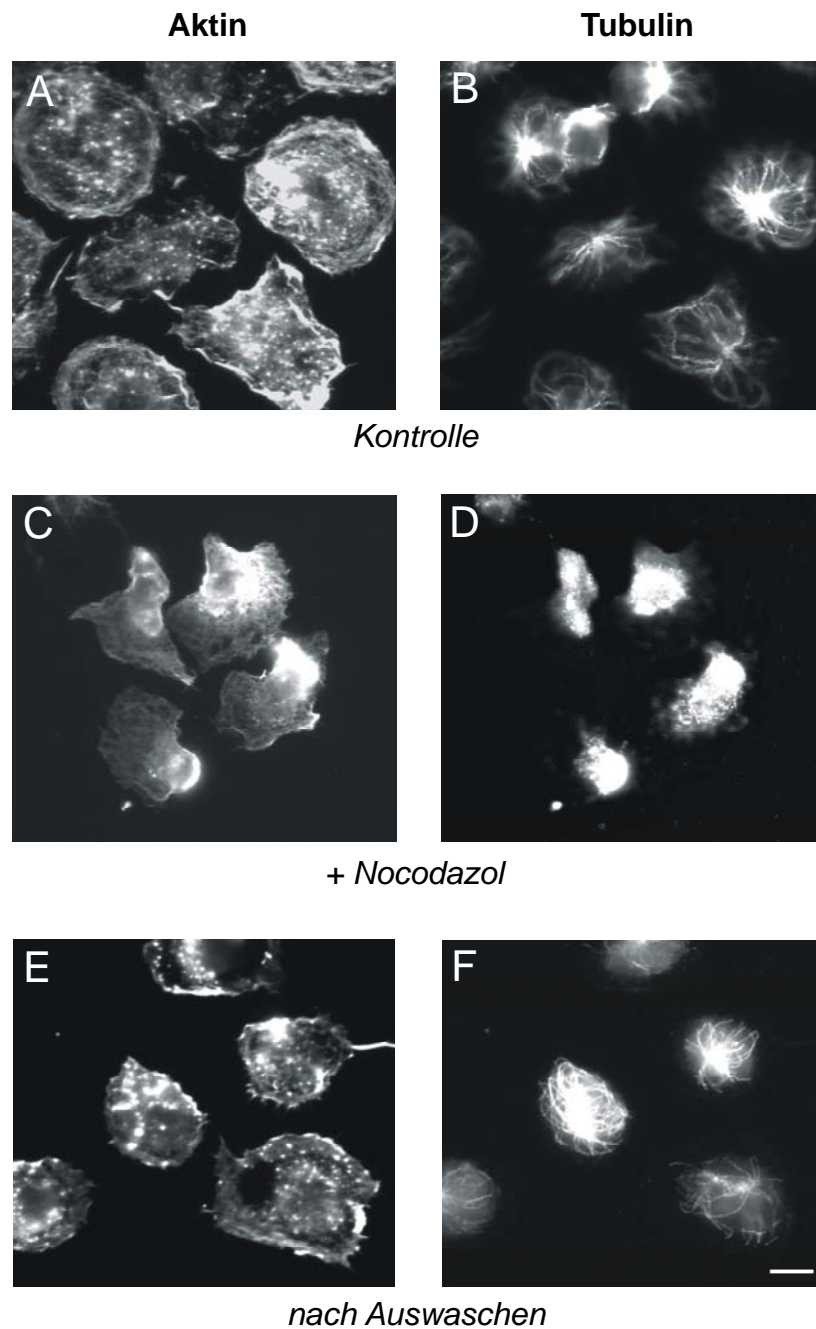
verhältnismäßig kleinen Volumen der Zelle gemeinsam auftreten. All diese Beobachtungen zeigen eine enge räumliche Nachbarschaft zwischen Podosomen und Mikrotubuli.

#### **3.4.2. Mikrotubuli sind notwendig für die Ausbildung von Podosomen während der Monozyten-Adhäsion**

Es stellte sich die Frage, ob diese räumliche Nähe auch mit einer funktionellen Interaktion einhergeht. Dazu sollte zuerst die mögliche Beteiligung von Mikrotubuli bei der erstmaligen Podosomen-Ausbildung von frisch isolierten Monozyten untersucht werden. Dazu wurden frisch aus dem Blut gesunder Spender isolierte Monozyten direkt auf Deckgläschen ausgesät. Nach einer durchschnittlichen Zeit von etwa 2 h waren in fast allen Zellen kleine Aktin-Punkte zu sehen, die zahlreichen Podosomen entsprachen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Monozyten ein gut entwickeltes Tubulin-Zytoskelett (Abb.3.19., A,B).

Wurde dem Medium, in dem sich die adhärierenden Monozyten befanden, eine Mikrotubuli-depolymerisierende Substanz wie Nocodazol oder Benomyl beigelegt, so unterblieb die Ausbildung von Podosomen. Die so behandelten Zellen enthielten erwartungsgemäß auch keine intakten Mikrotubuli (Abb.3.19., C,D). Die initiale, Podosomen-unabhängige Adhäsion konnte aber weiterhin noch stattfinden. Auch längere Adhäsionszeiten, z.B. 6 h, führten nicht zur Ausbildung von Podosomen, solange dem Medium eine Mikrotubuli-depolymerisierende Substanz beigegeben wurde. Wurden die unter Nocodazolbedingungen adhärierenden Zellen mehrmals in frischem Medium gewaschen, so kam es nach ca. 2 h zur regelhaften Bildung von Podosomen. Das Tubulin-Zytoskelett der Zellen war zu diesem Zeitpunkt vollkommen intakt (Abb.3.19., E,F).

Zerstörung der Mikrotubuli mit Substanzen, welche wie Vinblastin über einen anderen Mechanismus wirken als die zuvor beschriebenen, führten zu vergleichbaren Ergebnissen. So führt z.B. Vinblastin zur Destruktion der Mikrotubuli über die Ausbildung intrazytoplasmatischer Parakristalle (Starling, 1976).



**Abb.3.19. Intakte Mikrotubuli sind notwendig für die Podosomen-Ausbildung während der Monozyten-Adhäsion**

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von frisch isolierten humanen Monozyten, die auf Deckgläschen ausgesät wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin gefärbt (A,C,E), Tubulin mit anti- $\beta$ -Tubulin Antikörper (B,D,F). Kontrollzellen wurden in Standardmedium ausgesät (A,B) und 2 h später fixiert und gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt waren die aktinreichen Podosomen schon gut erkennbar. Ein Aliquot frisch isolierter Zellen wurde in Medium, das 1  $\mu$ M Nocodazol enthielt, ausgesät (C,D) und ebenfalls 2 h später fixiert. Durch Nocodazol wurden die Mikrotubuli depolymerisiert (D). Gleichzeitig konnten diese Zellen keine Podosomen ausbilden (C). Ein weiteres Aliquot Zellen wurde zuerst 2 h in Medium, das Nocodazol (1  $\mu$ M) enthielt, behandelt und nachfolgend mehrfach gewaschen und 2 h in Standardmedium inkubiert (E,F). Die Neubildung von Mikrotubuli (F) ging dabei mit der Ausbildung von Podosomen einher (E). Der weiße Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.



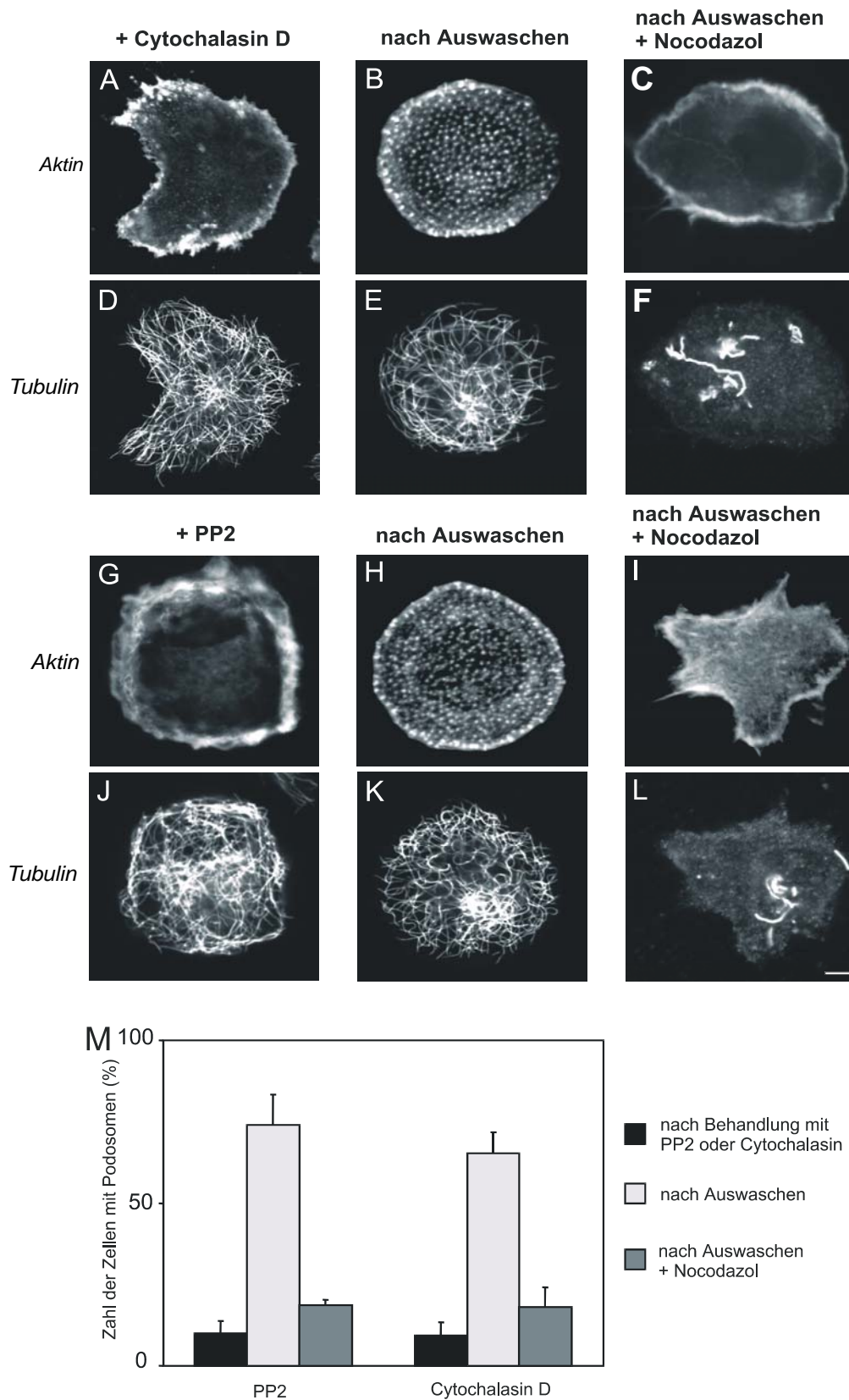
Auch die Behandlung von frisch isolierten Monozyten mit Taxol verhinderte größtenteils die Ausbildung von Podosomen. Taxol stabilisiert, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Substanzen, die Mikrotubuli (Schiff und Horwitz, 1980; Nogales *et al.*, 1999) und stört so ihre physiologische Dynamik. Das Unvermögen von Monozyten in diesen Versuchen Podosomen auszubilden, beruhte offenbar auf einer gestörten Mikrotubuli Dynamik.

### **3.4.3. Podosomen-Neubildung in adhärenenten Makrophagen ist abhängig von intakten Mikrotubuli**

Podosomen sind sehr dynamische Strukturen, die ständig auf- und abgebaut werden. Ihre Halbwertszeit wurde auf 2-12 min geschätzt (Kanehisa *et al.*, 1990). Da die Podosomen-Bildung in bereits adhärenenten Makrophagen eindeutig andere zeitliche Charakteristika aufweist als die Podosomen-Neubildung in frisch isolierten Monozyten, stellte sich die Frage, ob auch hier eine Abhängigkeit von intakten Mikrotubuli gegeben ist. Dazu wurde das Aktin-Zytoskelett fünf bis sieben Tage alter Zellen entweder mit Cytochalasin D (2  $\mu$ M, 1 h) direkt zerstört, oder alternativ wurde ein Auflösen der Podosomen indirekt durch Blockierung der für den Podosomen-Aufbau essentiellen Tyrosinphosphorylierung durch den Src Kinase Inhibitor PP2 (25  $\mu$ M, 1 h) erzielt. Durch diese Vorbehandlung wurden in fast allen Zellen die Podosomen zerstört (Zellen mit Podosomen:  $9.3 \pm 4.1\%$  für Cytochalasin D;  $10.0 \pm 3.7\%$  für PP2) (Abb.3.20., A,G,M). Im Vergleich dazu hatten in unbehandelten Kontrollzellen ca.  $94.0 \pm 4\%$  der Makrophagen Podosomen. Podosomen-Auflösung ging oft mit der Ausbildung prominenter Aktin-Klumpen im Zytoplasma einher. Durch die Auflösung der Podosomen mit den oben genannten Reagenzien wurde das Tubulin-Zytoskelett morphologisch nicht geschädigt (Abb.3.20., D,J). Durch Waschen und anschließende Inkubation der vorbehandelten Zellen für 1.5 h in frischem Medium, konnte eine Neubildung der Podosomen erreicht werden ( $65.3 \pm 6.4\%$  für Cytochalasin D;  $74.9 \pm 3\%$  für PP2 behandelte Zellfraktion) (Abb.3.20., B,H,M.). Längere Auswaschzeiten führten zur Podosomen-Assemblierung in fast allen Zellen.

Durch Zugabe von Nocodazol in das Auswaschmedium konnte der Einfluss von Mikrotubuli auf die Podosomen-Reassemblierung untersucht werden. Durch Nocodazol kam es zur Zerstörung der Mikrotubuli (Abb.3.20., F,L) und die Podosomen-Wiederbildung wurde unterdrückt (Zellen mit Podosomen:  $18.0 \pm 6.2\%$  für Cytochalasin D;  $18.7 \pm 1.6\%$  für PP2)

(Abb.3.20., C,I,M). Zellen, die während der Auswaschzeit mit Vinblastin behandelt wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse.



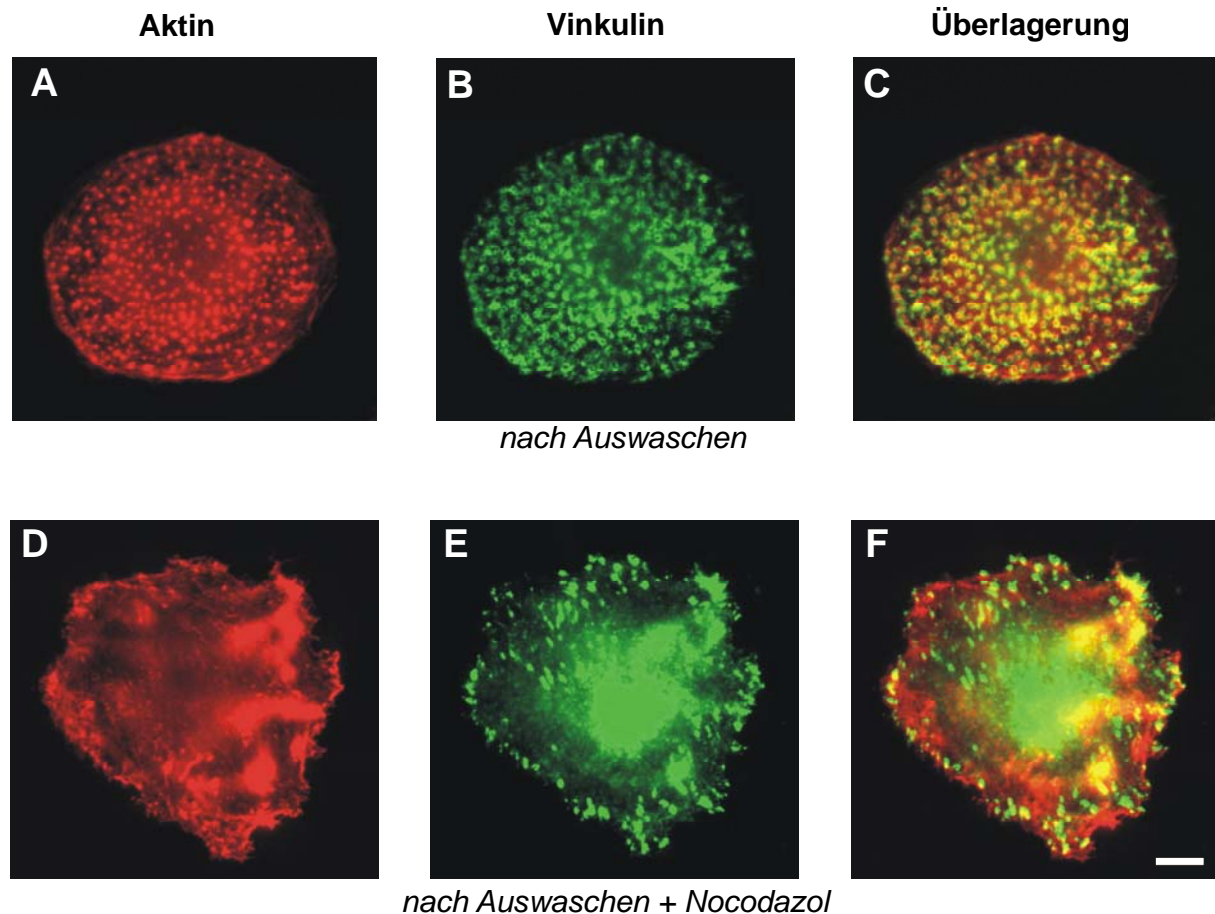
**Abb.3.20.** Die Podosomen-Reassemblierung in adhärenenten Makrophagen ist von intakten Mikrotubuli abhängig



Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die für sechs Tage auf Deckgläschen angezüchtet wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt (A-C,G-I), Tubulin mit anti- $\beta$ -Tubulin Antikörper (D-F, J-L). Die Podosomen wurden durch Behandlung mit Cytochalasin D (A-F) oder PP2 (G-L) zerstört. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Inkubation fixiert (A,D,G,J), in Standardmedium für 1.5 h nachinkubiert (B,E,H,K) oder in Standardmedium mit 1  $\mu$ M Nocodazol nachinkubiert (C,F,I,L). Zellen, die in Medium ohne Zusätze nachinkubiert wurden, hatten intakte Mikrotubuli und bildeten wieder Podosomen aus (B,E,H,K). In Zellen, in denen während der Nachinkubation die Mikrotubuli zerstört wurden, unterblieb die Neubildung von Podosomen (C,F,I,L). Der weiße Maßstab beträgt 10  $\mu$ m. (M) zeigt die Prozentzahl der Zellen, die nach Behandlung mit Cytochalasin D oder PP2 (schwarze Balken), nach Auswaschen dieser Substanzen (weiße Balken) und nach Auswaschen mit Zugabe von Nocodazol ins Auswaschmedium (graue Balken) Podosomen enthielten. Für jeden Wert wurden je 50 Zellen in mindestens drei unabhängigen Versuchen gezählt. Bei unbehandelten Zellen hatten weniger als 3% keine Podosomen.

Das Vorhandensein intakter Mikrotubuli ist also für die Bildung von Podosomen essentiell. Im Gegensatz dazu werden fokale Adhäsionen durch Mikrotubuli negativ reguliert, d.h. nach Zerstörung der Mikrotubuli kommt es zu einer Zunahme an fokalen Adhäsionen (Bershadsky *et al.*, 1996; Enomoto *et al.*, 1996).

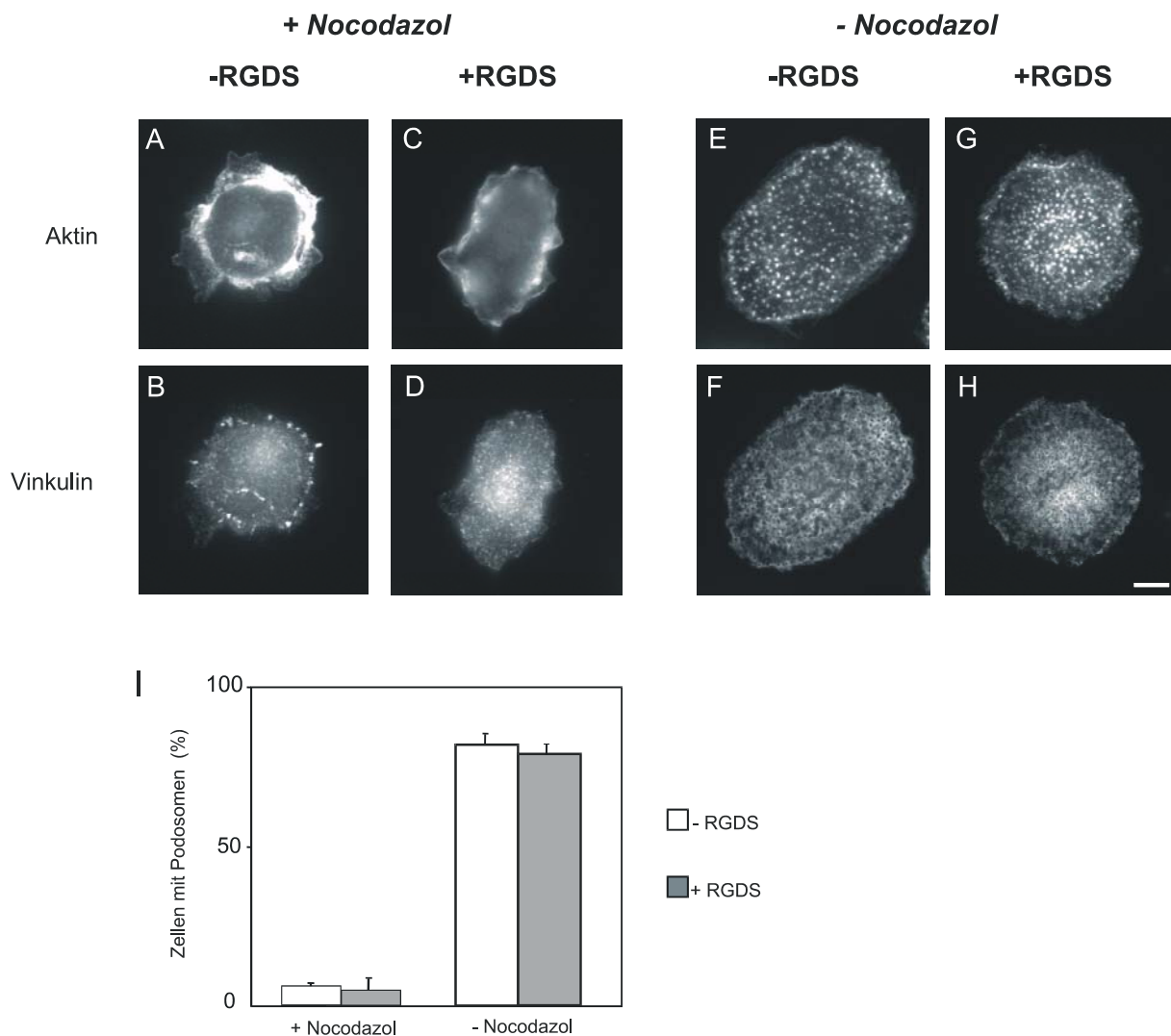
Färbte man in den Cytochalasin D bzw. PP2 Auswaschexperimenten die Zellen mit einem anti-Vinkulin Antikörper, so zeigte sich, dass beim Auswaschen in frischem Medium podosomentypische, ringförmige Vinkulin-Strukturen entstanden (Abb.3.21., A,B,C). Längliche Vinkulin Signale am Zellrand, die den fokalen Adhäsionen entsprachen, wurden nur in Ausnahmefällen beobachtet. Wurde dem Auswaschmedium Nocodazol beigegeben, so zeigte sich dagegen nach 1.5 h eine deutliche Akkumulation von Vinkulin in zahlreichen prominenten fokalen Adhäsionen (Abb.3.21., D,E,F). Dies wurde für andere Zellen bereits beschrieben (Bershadsky *et al.*, 1996; Enomoto *et al.*, 1996). Die Podosomen-Bildung war hingegen bei der Anwesenheit von Nocodazol im Medium, wie bereits erwähnt, fast vollständig unterdrückt. Auch hier wurde die entgegengesetzte, regulatorische Wirkung von Mikrotubuli auf Podosomen einerseits und fokale Adhäsionen andererseits deutlich.



**Abb.3.21. Podosomen und fokale Adhäsionen zeigen eine entgegengesetzte Abhängigkeit von Mikrotubuli**  
 Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von sechs Tage alten primären humanen Makrophagen. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin gefärbt (A,D) rote Farbe, Vinkulin mit anti-Vinkulin Antikörper (B,E), grüne Farbe, Überlagerung von (A) und (B) in (C) und von (D) und (E) in (F). Die Podosomen der Makrophagen wurden durch Behandlung mit Cytochalasin D zerstört. Diese Substanz wurde entweder in Standardmedium ausgewaschen (A-C) oder in Medium, dem 1  $\mu$ M Nocodazol beigegeben wurde (D-F). In Zellen mit intaktem Tubulin-Zytoskelett bilden sich Podosomen wieder aus (A-C), nicht jedoch in solchen, in denen die Mikrotubuli deassembliert worden waren (D-F). In Makrophagen, in denen die Mikrotubuli zerstört wurden, kam es dagegen zur Ausbildung von zahlreichen, prominenten fokalen Adhäsionen (D-F). Maßstab: 10  $\mu$ m.

Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen fokalen Adhäsionen und Podosomen genauer zu untersuchen, wollten wir ihre jeweilige Abhängigkeit von extrazellulärer Matrix und Integrinen testen. Dazu wurden sogenannte RGD- bzw. RGDS-Peptide benutzt. Diese Peptide enthalten die Integrin-bindende Region des Matrixproteins Fibronektin. Somit binden RGD- und RGDS-Peptide an die extrazelluläre Domäne einer großen Zahl von Integrinen, und können so deren Assoziation mit extrazellulärer Matrix verhindern und eine Signaltransduktion durch die intrazelluläre Domäne unterbinden. So kann man bei vielen verschiedenen Zellen die Ausbildung von fokalen Adhäsionen unterdrücken (Pirschbacher und Ruoslahti, 1984; Ruoslahti, 1996). In Übereinstimmung mit dem beschriebenen Effekt konnte auch bei primären humanen Makrophagen durch Zugabe von 1 mM RGDS ins

Medium die Ausbildung von fokalen Adhäsionen unterdrückt werden. Gab man nach Zerstörung des Aktin-Zytoskelett durch Cytochalasin D dem Auswaschmedium RGDS bei, so konnten sich keine fokalen Adhäsionen bilden (Abb.3.22., A-D,I). Die Reassemblierung von Podosomen nach ihrer Zerstörung wurde durch die Zugabe von 1 mM RGD oder auch RGDS nicht beeinflusst (Abb.3.22., E-H,I), solange dem Medium kein Nocodazol beigegeben wurde (Abb.3.22., I). Dies veranschaulicht die grundlegend unterschiedliche Empfindlichkeit von fokalen Adhäsionen und Podosomen auf Fibronectin-Peptide.



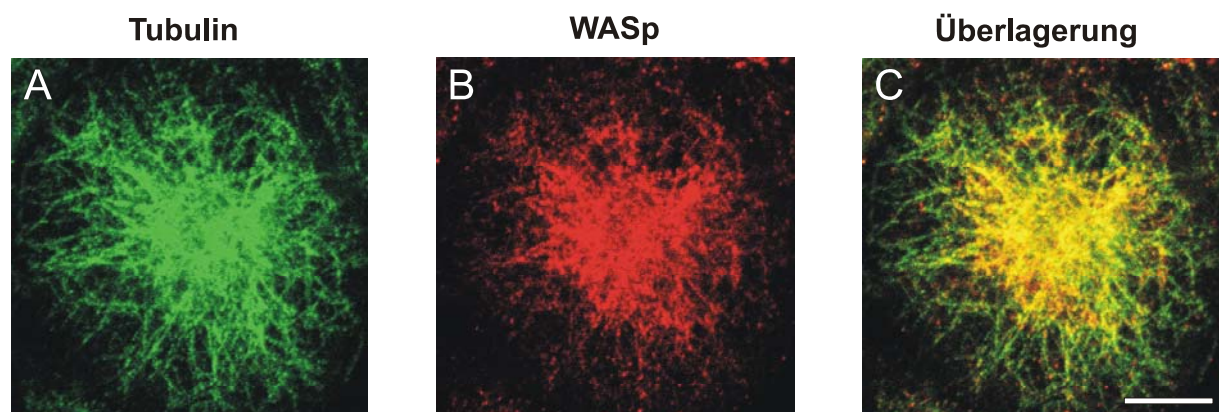
**Abb.3.22. Der Einfluss von Mikrotubuli und RGDS-Peptid auf Podosomen und fokale Adhäsionen**

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die für sechs Tage auf Deckgläschen angezüchtet wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt (A,C,E,G), Vinkulin mit anti-Vinkulin Antikörper (B,D,F,H). Die Podosomen der primären humanen Makrophagen wurden durch Zugabe von Cytochalasin D ins Medium deassembliert. Nach 1 h wurden die Zellen mit (A-D) oder ohne (E-H) Zugabe von Nocodazol ins Auswaschmedium, bzw. mit (C,D,G,H) oder ohne (A,B,E,F) 1 mM RGDS-Peptid gewaschen. Der weiße Maßstab entspricht 10 µm. (I) Diagramm, in dem die Zahl von podosomenhaltigen Zellen nach der entsprechenden Behandlung dargestellt ist. Weiße Balken: ohne RGDS-Peptid, graue Balken: mit Zusatz von 1 mM RGDS-Peptid ins Auswaschmedium. Für jeden Wert wurden mindestens 30 Zellen in drei unabhängigen Versuchen gezählt. In unbehandelten Zellen hatten mehr als 97% der Makrophagen Podosomen.

Zusammenfassend verdeutlichten diese Versuche die großen Unterschiede zwischen Podosomen und fokalen Adhäsionen. Mikrotubuli Depolymerisation verhinderte die Neubildung von Podosomen, führte aber zum Wachstum von fokalen Adhäsionen. Des Weiteren war die Podosomen-Bildung durch 1 mM RGDS nicht beeinflussbar, welches aber die Ausbildung von fokalen Adhäsionen vollständig verhinderte.

#### 3.4.4. Mikroinjektion der WASp-Polyprolin Domäne hemmt die Podosomen-Ausbildung

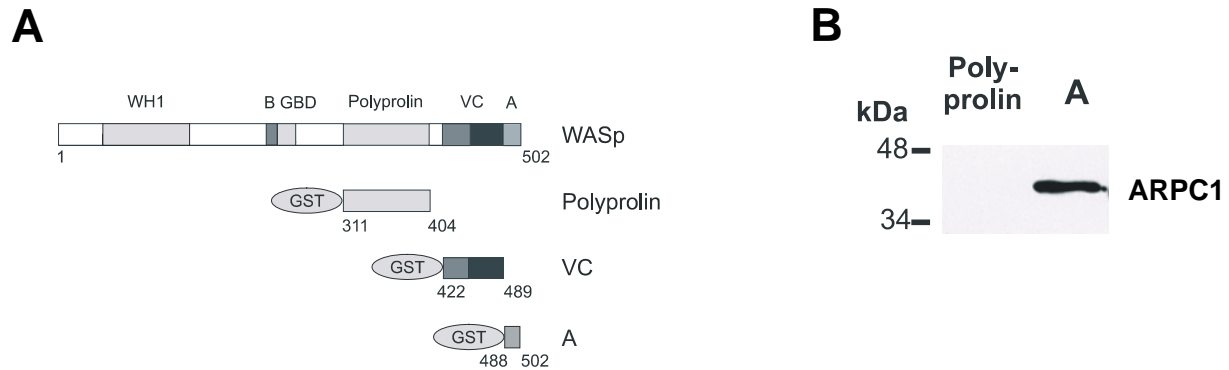
Auf der Suche nach einer Erklärung für die Abhängigkeit der Podosomen-Assemblierung von intakten Mikrotubuli wurden folgende Beobachtungen kombiniert: 1) WASp ist notwendig für die Podosomen-Assemblierung (Linder *et al.*, 1999) und 2) WASp kann über das “CDC42 Interacting Protein” CIP4 an Mikrotubuli binden (Tian *et al.*, 2000). Tatsächlich lokalisiert WASp in primären Makrophagen teilweise an Mikrotubuli (Abb.3.23., A,B,C).



**Abb.3.23. WASp und Mikrotubuli können in primären humanen Makrophagen teilweise kolokalisieren**  
Konfokale Laser-Mikroskop Aufnahmen, die das obere Drittel eines sieben Tage alten Makrophagen darstellen. Die Bilder wurden durch Überlagerung von jeweils vier verschiedenen horizontalen Schnittebenen erzeugt. Tubulin wurde mit anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper (A), grüne Farbe, WASp mit anti-WASp Antikörper (B), rote Farbe angefärbt. (C) zeigt die Überlagerung aus (A) und (B), wobei gelbe Farbe Kolokalisation anzeigt. Der weiße Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Die Bindung von WASp an CIP4 wird durch seine Polyprolin Domäne vermittelt. Deshalb stellten wir ein Konstrukt dieser Domäne her (Abb.3.24., A), und injizierten es in primäre humane Makrophagen. Da der WASp Effektor Arp2/3 Komplex über Polyprolin Säulen aufgereinigt wurde (Machesky *et al.*, 1994), wurde zuvor getestet, ob die WASp-Polyprolin Domäne eventuell mit Arp2/3 Komplex interagieren und so die Aktin Nukleation

beeinflussen könnte. In einem GST-“Pull-down“-Versuch wurde die Bindung der WASp-Polyprolin Domäne an Arp2/3 Komplex untersucht. Als Kontrolle diente das GST-A Konstrukt, von dem eine Bindung an Arp2/3 Komplex bereits bekannt war. Die Polyprolin Domäne von WASp interagiert in dieser Versuchsanordnung nicht mit Arp2/3 Komplex (Abb.3.24., B).



**Abb.3.24. Darstellung der verwendeten WASp Konstrukte sowie Überprüfung des Bindungsverhalten der Polyprolin Domäne**

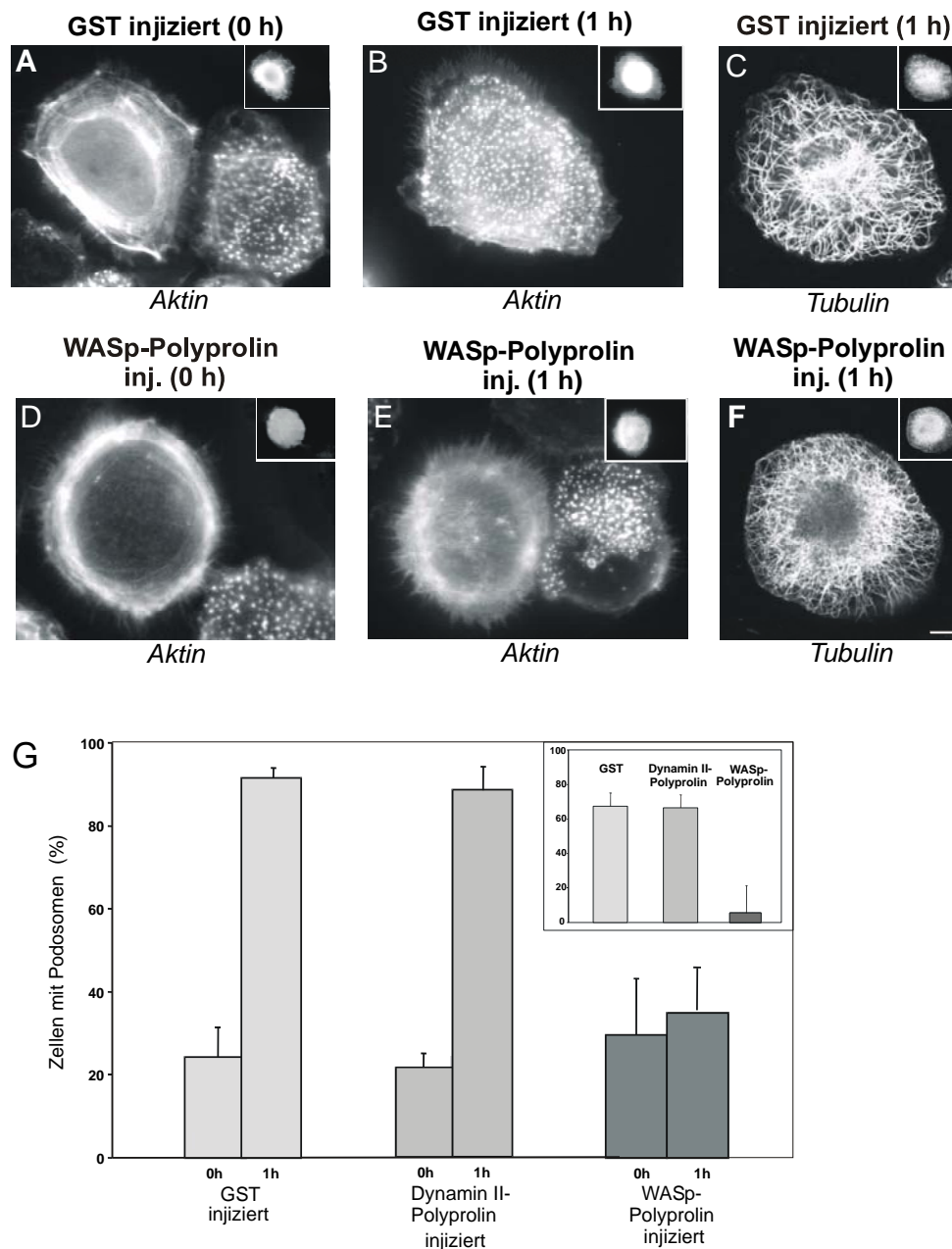
(A) Domänenstruktur von WASp: WASp Homologie1 Domäne (WH1), Basische Region (B), GTPasen-Bindungs Domäne (GBD), Polyprolin Domäne, WH2/Verprolin-homologe Region (V), Zentrale Region (C) und eine Sequenz von sauren (A) Aminosäuren (Übersicht in: Higgs und Pollard, 2001). Die Zahlen bezeichnen die jeweils erste und letzte Aminosäure der Proteine, die in dieser Untersuchung als GST-Fusionsprotein verwandt wurden. (B) Die WASp-Polyprolin Domäne bindet nicht an Arp2/3 Komplex. Western Blot eines GST-“Pull-down“-Versuchs, der mit der WASp-Polyprolin und A Region durchgeführt wurde. Der Blot wurde mit einem Antikörper gegen ARPC1 (die p41 Untereinheit) des Arp2/3 Komplexes inkubiert. Gewichte in kDa sind links angegeben.

Zur weiteren Charakterisierung der Mikrotubuli-Abhängigkeit der Podosomen-Bildung, machten wir uns ein Artefakt der Mikroinjektion humaner Makrophagen zunutze. Erfolgte die Mikroinjektion mit genügend hohem Druck, so kam es zu einer transienten Zerstörung der Podosomen. Dies konnte durch Anfärbung von Aktin, WASp oder Vinkulin gezeigt werden. Das regelhafte Wiederauftreten der Podosomen konnte nach 30-60 Minuten in beinahe allen Zellen beobachtet werden. Dieser Sachverhalt wurde genutzt, um die Neubildung von Podosomen nach Injektion einer Proteindomäne zu untersuchen.

Zur Kontrolle wurden Makrophagen mit GST injiziert. Die meisten dieser Kontrollmakrophagen verloren ihre Podosomen nach 2 min (Zellen mit Podosomen:  $24.3 \pm 7.5\%$ ) (Abb.3.25., A,G), im Verlauf 1 h bildeten fast alle Makrophagen wieder regelhaft Podosomen aus (Zellen mit Podosomen:  $91.7 \pm 2.3\%$ ) (Abb.3.25., B,G). Auch nach Injektion der WASp-Polyprolin Domäne verlor die überwiegende Zahl der Makrophagen ihre Podosomen (Zellen mit Podosomen:  $29.7 \pm 13.5\%$ ) (Abb.3.25., D,G), es kam aber nicht wieder zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl mit Podosomen während der



Nachinkubation (Zellen mit Podosomen:  $35.0 \pm 0.2\%$ ) (Abb.3.25., E,G). So konnte weder in der Aktin noch in der Vinkulin oder WASp Färbung eine podosomale Lokalisation dieser Proteine festgestellt werden. Die WASp-Polyprolin Domäne verhinderte offensichtlich die Neubildung von Podosomen. Dieser Effekt war nicht auf eine Schädigung des Tubulin-Zytoskeletts zurückzuführen, da in den GST als auch den GST-Polyprolin injizierten Zellen, das Tubulin-Zytoskelett intakt erschien (Abb.3.25., C,F).



**Abb.3.25. Die Wiederausbildung von Podosomen kann durch Injektion der WASp-Polyprolin Domäne gehemmt werden**

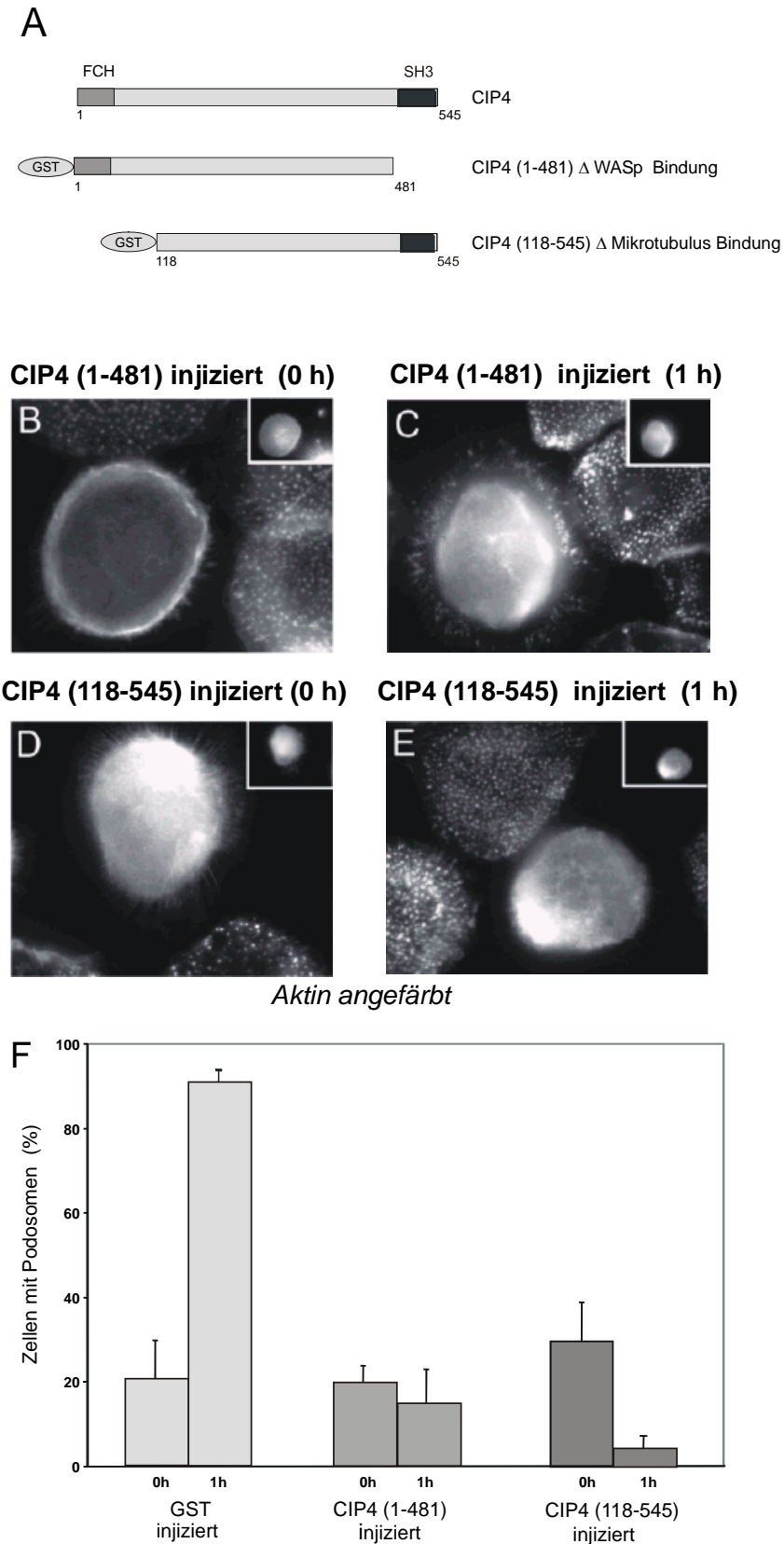
Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen (A,B,D,E) und Laser-mikroskopische Aufnahmen (C,F) von mikroinjizierten Makrophagen, die zuvor für sechs Tage auf Deckgläschen kultiviert worden waren. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin (A,B,D,E) gefärbt, Tubulin mit anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper (C,F). Die kleinen eingefügten Bilder sind die Injektionskontrollen. Hierfür wurde koinjiziertes Ratten IgG angefärbt. Die

Makrophagen wurden mit GST allein als Kontrolle (A-C) oder mit einem GST-Fusionsprotein der WASp-Polyprolin Domäne injiziert (D-F). Die Zellen wurden entweder direkt nach der Injektion fixiert (A,D) oder nach einer zusätzlichen Inkubation für 1 Stunde (B,C,E,F). Wurden die Zellen mit genügend hohem Druck injiziert, so kam es zum Verlust der Podosomen (A,D). GST injizierte Zellen hatten nach 1 h Nachinkubation fast vollständig wieder Podosomen ausgebildet (B), während solche Zellen, die mit der WASp-Polyprolin Domäne injiziert worden waren, dies nicht taten (E). Mikrotubuli in den injizierten Zellen erschienen morphologisch unverändert (C,F). Der weiße Maßstab entspricht 10  $\mu$ m. Das Diagramm (G) zeigt die Anzahl der Zellen in % die 0 h bzw. 1 h nach der Injektion Podosomen aufwiesen. GST injizierte Zellen (weiße Balken), Dynamin II-Polyprolin Domäne injizierte Zellen (graue Balken) und WASp-Polyprolin Domäne injizierte Zellen (schwarze Balken). Das eingefügte Bild zeigt die Zahl der Makrophagen, die ihre Podosomen nach der Zerstörung durch die Injektion innerhalb 1 h neu ausbildeten. Für jeden Wert wurden mindestens 30 Zellen in drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Um die Spezifität der WASp-Polyprolin Domäne zu testen, wurden Zellen mit der Polyprolin Domäne von Dynamin II injiziert. Die Werte ähnelten in diesem Fall denen für GST. Direkt nach der Injektion verloren die meisten Zellen ihre Podosomen (Zellen mit Podosomen:  $18.7 \pm 2.3\%$ ) (Abb.3.25., G). Fast alle Makrophagen bildeten innerhalb 1 h nach der Injektion wieder Podosomen aus ( $86.0 \pm 6.6\%$ ) (Abb.3.25., G). Dabei ist bemerkenswert, dass Dynamin II in den Podosomen von Rous Sarkoma Virus transformierten Fibroblasten ein essentieller Bestandteil ist (Ochoa *et al.*, 2000).

#### 3.4.5. Injektion von CIP4 Deletions-Mutanten hemmt die Podosomen-Ausbildung

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob CIP4 einen Einfluss auf die Podosomen-Ausbildung hat. Dazu wurden zwei CIP4 Deletions-Konstrukte, bei denen entweder die WASp Bindungsstelle, CIP4 (1-481) (Abb.3.26, A), oder die Mikrotubuli Bindungsstelle, CIP4 (118-545) (Abb.3.26, A), deletiert worden waren, benutzt (Tian *et al.*, 2000). Zur Kontrolle wurde nur GST injiziert. Die meisten der GST injizierten Zellen verloren ihre Podosomen (Zellen mit Podosomen:  $20.0 \pm 8.7\%$ ) (Abb.3.26, F). In diesen Kontrollzellen waren nach einstündiger Nachinkubation in  $93.3 \pm 2.7\%$  wieder regelhafte Podosomen vorhanden (Abb.3.26., F). Auch die mit den CIP4 Deletions-Konstrukten injizierten Zellen verloren durch die Injektion ihre Podosomen (Zellen mit Podosomen: für CIP4 (1-481)  $19.0 \pm 5.7\%$ ; für CIP4 (118-545)  $30.0 \pm 9.3\%$ ) (Abb.3.26., B,C,F). Die Wiederausbildung von Podosomen blieb aber in beiden Fällen aus (Zellen mit Podosomen: für CIP4 (1-481)  $15.7 \pm 8.3\%$ ; für CIP4 (118-545)  $3.0 \pm 2.7\%$ ) (Abb.3.26., D,E,F). Zusätzlich kam es bei der Injektion der CIP4 (118-545) Deletions-Mutante zu einem weiteren Verlust von Podosomen während der einstündigen Nachinkubation (Abb.3.26., F).



**Abb.3.26. Die Neubildung von Podosomen kann durch Mikroinjektion von CIP4 Deletions-Mutanten verhindert werden**

Die Domänenorganisation von CIP4 ist in (A) dargestellt: die Mikrotubuli Bindungsstelle, Fer und Fes/Fps Homologie Domäne (FCH) und die WASp-bindende Src Homologie3 Domäne (SH3). Die Zahlen bezeichnen die erste und letzte Aminosäure der GST-Fusionskonstrukte. (B-E) zeigt Immunofluoreszenz Aufnahmen von sieben Tage alten Makrophagen. Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin gefärbt, die kleinen Bilder zeigen angefärbtes Ratten IgG, das als Injektionsmarker diente. Die Makrophagen wurden mit Deletions-Konstrukten



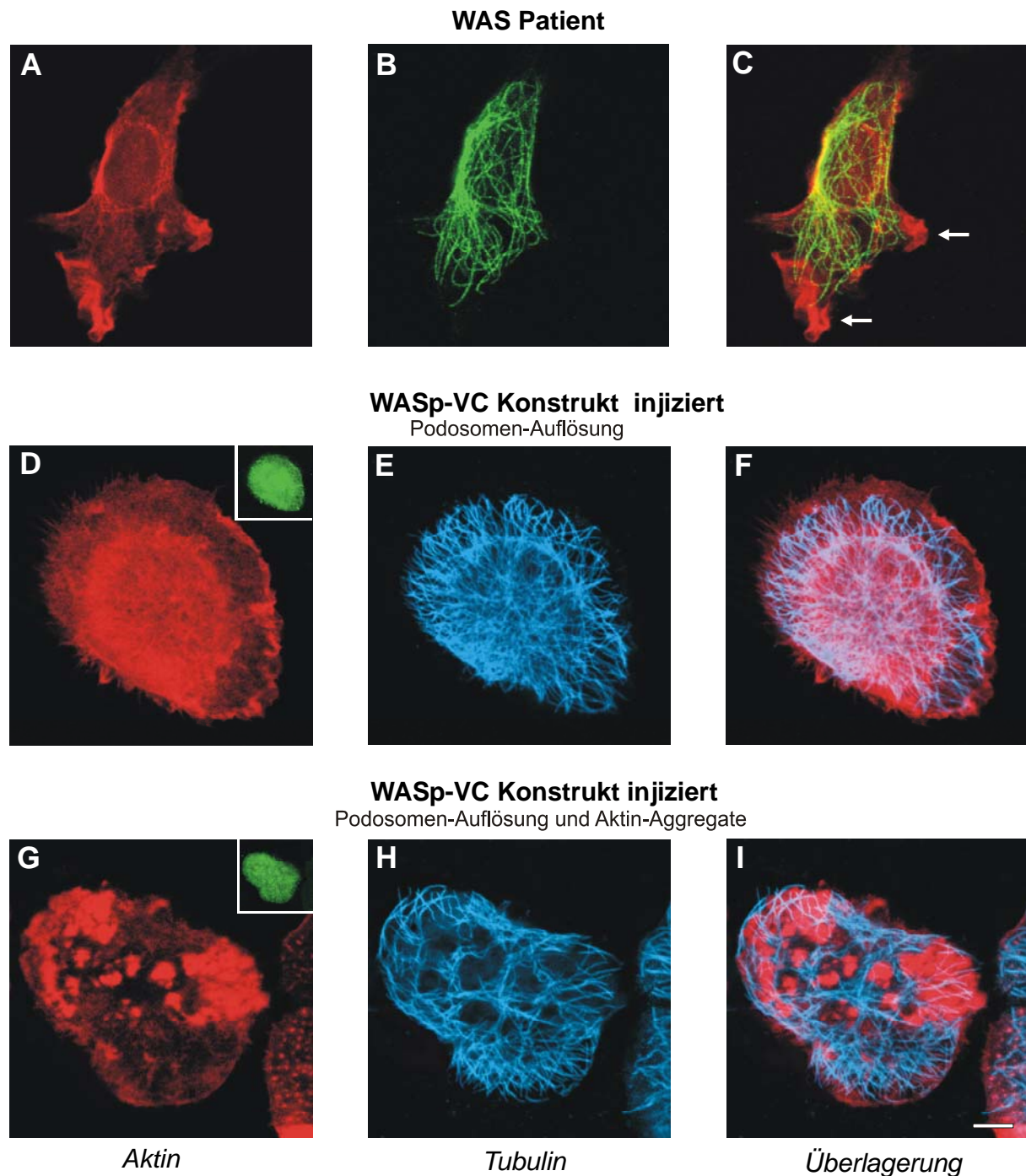
von CIP4 injiziert, denen die WASp-bindende SH3 (CIP4 (1-481)) (B,C) oder die Mikrotubuli-bindende FCH Region (CIP4 (118-545)) (D,E) fehlte. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Injektion fixiert (B,C) oder nach 1 h Nachinkubation (D,E). Mikroinjektion der Makrophagen mit hohem Druck führte zu einem Verlust der Podosomen (B,D). Zellen, die mit einem der beiden Deletions-Konstrukte von CIP4 injiziert worden waren, bildeten während der Nachinkubation im Gegensatz zu Kontrollzellen keine Podosomen aus (C,E). Der weiße Maßstab entspricht 10 µm. Das Diagramm (F) zeigt die Anzahl der Zellen in %, die 0 h bzw. 1 h nach der Injektion Podosomen aufwiesen. GST injizierte Zellen (weiße Balken), CIP4 (1-481) injizierte Zellen (graue Balken) und CIP4 (118-545) injizierte Zellen (schwarze Balken). Für jeden Wert wurden mindestens 30 Zellen in drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch Mikroinjektion von CIP4 Deletions-Konstrukten, denen entweder die Mikrotubuli Bindungsstelle oder die WASp Bindungsstelle fehlt, die Reassemblierung von Podosomen in primären humanen Makrophagen verhindert wurde.

#### **3.4.6. Das Tubulin-Zytoskelett wird durch Fehlen der Podosomen nicht beeinflusst**

Da die Ausbildung von Podosomen als eine Funktion des Aktin-Zytoskeletts von intakten Mikrotubuli abhängig war, stellte sich die Frage, ob im Umkehrschluss auch das Fehlen von Podosomen einen Einfluss auf das Tubulin-Zytoskelett hat.

Als Modell für Zellen, die Defekte in der Podosomen-Bildung besitzen, dienten Makrophagen von WAS Patienten. Diese Zellen weisen durch eine Genmutation ein gestörtes Aktin-Zytoskelett auf und bilden keine Podosomen aus. In diesen Zellen schien das Tubulin-Zytoskelett morphologisch verändert, sowohl in Bezug auf die Form, als auch die Orientierung der einzelnen Mikrotubuli (Abb.3.27., A,B,C). Die Veränderungen in der Form des Tubulin-Zytoskeletts waren jedoch höchstwahrscheinlich auf die unregelmäßige Zellform der WAS Makrophagen zurückzuführen. Die Unregelmäßigkeiten in der Orientierung der Mikrotubuli in WAS Makrophagen schienen mit der Ausbildung von Aktin-Klumpen im Zytoplasma zu korrelieren (Abb.3.27., C, Pfeile).



**Abb.3.27. Die Unregelmäßigkeiten im Zytoskelett von WAS Makrophagen oder GST-VC injizierten Zellen sind auf ungeordnete Aktin-Akkumulationen im Zytoplasma und nicht auf das Fehlen von Podosomen zurückzuführen**

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von primären humanen Makrophagen. F-Aktin wurde mit Alexa-568 Phalloidin angefärbt, rote Farbe (A,D,G), Tubulin mit anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper, grün (B) bzw. blau (E,H). Die kleinen Bilder zeigen Ratten IgG als Injektionsmarker in Grün (D,G). Überlagerung von (A) und (B) in (C), von (D) und (E) in (F), und von (G) und (H) in (I). (A-C) Makrophage eines WAS Patienten. Dieser enthält typischerweise keine Podosomen und zeigt ein ungeordnetes Tubulin-Zytoskelett, sowie spontane Aktin Verklumpungen im Zytoplasma. (D-I) Makrophage eines gesunden Spenders der mit dem GST-VC Konstrukt injiziert wurde. GST-VC Injektion geht meist mit Podosomen-Auflösung einher (D-F) und führt zusätzlich in vielen Fällen zum Auftreten von ungeordneten Aktin-Akkumulationen im Zytoplasma (G-I). Die Injektion von gesunden Makrophagen mit dem GST-VC Konstrukt und das damit assoziierte Verschwinden der Podosomen führte nicht zu einer Störung des Tubulin-Zytoskeletts (D-F). Nur durch das Auftreten von Aktin-Klumpen wurden die Mikrotubuli zu einer Umorganisation gezwungen (G-I). Der weiße Maßstab entspricht 10  $\mu$ M.

Es sollte nun untersucht werden ob das Fehlen der Podosomen oder die Ausbildung von Aktin-Aggregaten, für die Unregelmäßigkeiten in der Mikrotubuli-Orientierung in diesen Zellen verantwortlich waren. Ein erster Hinweis war die morphologische Integrität des Tubulin-Zytoskeletts in Zellen, die mit der WASp-Polyprolin Domäne injiziert worden waren. Um den Phänotyp der WAS Makrophagen zu imitieren und Zellen zu erzeugen, in denen sowohl die Podosomen fehlen als auch Aktin-Aggregate im Zytoplasma vorkommen, wurden Zellen gesunder Spender mit der WASp GST-VC Region injiziert. Die Injektion des GST-VC Konstruktes führte meist zum Auflösen der Podosomen und je nach Konzentration des injizierten Proteins und Dauer der Nachinkubation in den meisten Zellen (bis zu 80%) zur Ausbildung von multiplen Aktin-Klumpen (Linder *et al.*, 1999) (Abb.3.27. D-I). Diese ähneln den Aktin-Klumpen, die in einigen WAS Makrophagen gefunden werden. Wurden nach Injektion der GST-VC Region in Zellen gesunder Spender keine Aktin-Klumpen gebildet, so blieb das Tubulin-Zytoskelett unbeeinflusst (Abb.3.27., D,E,F). Bei der Ausbildung von Aktin-Klumpen erschien jedoch das Tubulin-Zytoskelett morphologisch verändert (Abb.3.27., G,H,I). Es kam zu einer Umorientierung der Mikrotubuli um die induzierten Aktin-Aggregate.

Es ist deshalb anzunehmen, dass nicht das Fehlen der Podosomen, sondern die ungeordneten Aktin-Akkumulationen zu einer Umorientierung des Tubulin-Zytoskeletts führten. Dies schien sowohl bei WAS Makrophagen, als auch bei gesunden Zellen, die mit der GST-VC Region injiziert wurden, der Fall zu sein. Dieser Befund steht im Einklang mit den bereits beschriebenen Beobachtungen, dass nach Cytochalasin D oder PP2 Behandlung das Tubulin-Zytoskelett morphologisch unbeeinflusst erschien.

### **Zusammenfassung**

- Mikrotubuli sind für die initiale Ausbildung von Podosomen in Monozyten und für die Neubildung von Podosomen in reifen Makrophagen notwendig
- WASp kann mit Mikrotubuli kolokalisieren
- Mikroinjektion der WASp-Polyprolin Region, die via CIP4 an Mikrotubuli bindet, kann die Podosomen-Neubildung verhindern
- Mikroinjektion von CIP4 Deletions-Konstrukten verhindert die Podosomen-Bildung

**Mikrotubuli sind essentiell für die Podosomen-Bildung in primären humanen Makrophagen. Die Lokalisation von WASp via CIP4 an Mikrotubuli ist hierbei höchst wahrscheinlich von funktioneller Bedeutung.**

**...aber man verlangt vom Forscher, dass er Beweise liefert,  
wenn es sich zum Beispiel um die Entdeckung eines großen  
Berges handelt, verlangt man, dass er große Steine mitbringt**

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)  
französischer Philosoph, Flieger und Schriftsteller

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Zusammenspiel von WASp C-Terminus und Arp2/3 Komplex bei der Aktin Nukleation *in vitro* und *in vivo***

#### **4.1.1. Abhängigkeit der Nukleations-Aktivierung von der Bindungsaffinität *in vitro***

Bisherige Untersuchungen gingen davon aus, dass die vollständige VCA Domäne notwendig für die Arp2/3 Komplex Aktivierung ist. Dabei erschien die hochaffine Bindung sowohl von Aktin als auch von Arp2/3 Komplex an die WASp-VCA Domäne eine unabdingbare Voraussetzung für die Nukleations-Aktivierung. Die in dieser Arbeit zusammengefassten Studien untersuchen die Bindungsaffinitäten der einzelnen VCA Teildomänen und ihren Beitrag zur Nukleations-Aktivierung nun erstmals detailliert.

Die V Region vermittelt die hohe Affinität der GST-VCA Domäne für Aktin (Higgs *et al.*, 1999; Machesky und Insall, 1998; Miki und Takenawa, 1998) und ist unverzichtbar für die Arp2/3 Komplex Aktivierung (diese Studien). Die C Region wirkt sowohl bei der Aktin (Higgs *et al.*, 1999) als auch der Arp2/3 Komplex Bindung mit (Marchand *et al.*, 2001; diese Studien) und auch sie ist notwendig für die Arp2/3 Komplex Aktivierung (diese Studien). Die A Region vermittelt sowohl wenn sie an GST gekoppelt ist (diese Studien), aber auch wenn sie als synthetisches Peptid verwendet wird (Marchand *et al.*, 2001), eine Bindung an Arp2/3 Komplex mit hoher Affinität. Sie vermag den Komplex aber *in vitro* nicht vollständig zu aktivieren (Marchand *et al.*, 2001; diese Studien). In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass, ein Konstrukt, dem die A Region fehlt (GST-VC), den Arp2/3 Komplex nicht mehr in messbarem Ausmaß binden kann, es vermag ihn aber *in vitro* immer noch zu aktivieren. Dies wurde durch Messung der Nukleation von Aktin-Filamenten im Fluorimeter als auch durch direkte Observation von *in vitro* generierten Aktin-Filamenten unter dem Licht-Mikroskop belegt. Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine nur kurzzeitige Interaktion zwischen GST-VC und Arp2/3 Komplex ausreicht, um zu einer Nukleations-Aktivierung zu führen (Übersicht über die Funktionen der WASp C-terminalen Regionen: Tabelle 4.1.).

Diese Studien zeigen zum ersten Mal, dass die Funktion von WASp nicht einfach aus der Summe der einzelnen Domänen-Modulen erklärt werden kann, sondern dass es wichtige Interaktionen und synergistische Effekte zwischen den einzelnen Regionen gibt. Ein postuliertes Nukleationsmodell basiert auf der Vorstellung, dass die VCA Region von

WASp/Scar Proteinen durch die Bindung von sowohl Arp2/3 Komplex, als auch eines Aktin-Monomers einen stabilen, energetisch günstigen Nukleations-Kern bildet (Übersicht bei May, 2001; Marchand *et al.*, 2001). Sollte dieses Modell die tatsächlichen Verhältnisse korrekt beschreiben, so müsste eine Abnahme der Affinität für entweder Arp2/3 Komplex oder Aktin die Nukleations-Aktivierung der VCA Region vermindern. Die neuen Ergebnisse aus dieser Studie stehen in Einklang mit diesem Modell. Die Deletion der V (Marchand *et al.*, 2001) oder A Regionen (diese Studien) der VCA Domäne reduzierte die Affinität für Aktin bzw. Arp2/3 Komplex und führte so zu einer Verminderung der Nukleations-Aktivierung durch die jeweiligen Konstrukte.

In dem beschriebenen Nukleationsmodell geht man davon aus, dass die C Region einen Aktivierungsschritt auslöst, nachdem Aktin und Arp2/3 Komplex an WASp gebunden wurden (Marchand *et al.*, 2001). Unsere Beobachtung, dass die C Region unentbehrlich für die Aktin Nukleations-Aktivierung ist, unterstützt diese These. Auch Analysen, die zeigen, dass Mutationen in dieser Region von WASp zu einer meist schwerwiegenden Form von Wiskott-Aldrich Syndrom führen (Ochs, 1998), belegen diesen Gedanken.

Die in dieser Studie gemessenen Werte für die Affinität von GST-VCA für Aktin ( $0.29 \mu\text{M}$ ) und Arp2/3 Komplex Bindung ( $0.11 \mu\text{M}$ ) waren zwei- beziehungsweise achtmal höher als die Werte, die für ein GST-freies VCA Polypeptid gemessen wurden (Marchand *et al.*, 2001). Diese höheren Affinitäten könnten die 50-mal stärkere Nukleations-Aktivierung der GST-VCA im Vergleich zu GST-freier VCA erklären (Higgs und Pollard, 2000). Die beschriebene Beobachtung stützt dabei weiterhin die Überlegung, dass die VCA Domäne Aktin und Arp2/3 Komplex zusammenbringt, um einen stabilen Nukleations-Kern zu bilden. Auch die hier gemessene Bindung von GST-CA bzw. GST-A an Arp2/3 Komplex ist durch den GST-Anteil, im Vergleich zu den mit GST-freien Proteinen gemessenen Werten, ähnlich verstärkt (achtfach bzw. neunfach; Marchand *et al.*, 2001). Der Grund für die höhere Affinität der GST-Fusionsproteine bleibt zur Zeit noch etwas unklar. Es besteht die Möglichkeit, dass es durch den GST-Anteil zu einer Stabilisierung der sonst ungeordneten VCA Struktur kommt. Eine Bindung von GST an Arp2/3 Komplex oder Aktin konnte in diesen Versuchen ausgeschlossen werden.

#### 4.1.2. Arp2/3 Komplex Aktivierung durch WASp C-terminale Konstrukte in humanen Zellen

Mikroinjektion der GST-VCA oder GST-VC Konstrukte in primäre humane Makrophagen oder HUVEC führte zum Auftreten von Aggregaten aus polymerisiertem Aktin im Zytoplasma der injizierten Zellen. Die durchgeführten Versuche geben Hinweise darauf, dass es sich dabei um Aggregate handelt, die durch Aktivierung von endogenem Arp2/3 Komplex entstanden waren. Die Aktivierung erfolgte dabei durch die injizierten Konstrukte. Der Gehalt an polymerisiertem Aktin lag in GST-VCA oder GST-VC injizierten Zellen 1.64- bzw. 1.97-fach höher als in den GST injizierten Kontrollzellen. Endogener Arp2/3 Komplex, nicht aber zelluläres WASp, lies sich in den durch die Injektionen induzierten Aggregaten nachweisen. Weder GST-A noch GST-V konnten Aktin-Aggregationen hervorrufen. Dies bestätigt die zuvor beschriebene Beobachtung, dass beide Konstrukte Arp2/3 Komplex *in vitro* nicht vollständig aktivieren können (Übersicht über die Funktionen der WASp C-terminalen Regionen: Tabelle 4.1.).

Auch die Injektion von GST-CA und GST-C verursachte Aggregationen aus polymerisiertem Aktin in den injizierten Zellen. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu der vorher besprochenen Unfähigkeit dieser Konstrukte, Arp2/3 Komplex *in vitro* zu aktivieren. Es war jedoch auffällig, dass die durch GST-CA induzierten Aktin-Aggregate weit weniger prominent waren als solche, die durch GST-VCA oder GST-VC hervorgerufen wurden. Weiterhin enthielten die CA-induzierten Aggregate nicht nur Arp2/3 Komplex, sondern auch zelluläres WASp. Dies deutet darauf hin, dass sie durch einen anderen Mechanismus als die VC-induzierten Aggregate entstanden waren. Eine Möglichkeit wäre, dass die C Region des injizierten Konstrukts an die GBD Region des endogenen WASp bindet und so zur Aufhebung der Autoinhibition und zur Aktivierung führt (Rohatgi *et al.*, 2000; Prehoda *et al.*, 2000; Higgs und Pollard, 2000). Allerdings banden GST-Fusionsproteine, welche die C Region enthielten, kein WASp aus Makrophagenlysaten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die beobachteten Aggregate nicht aus neugebildeten Aktin-Filamenten bestanden, sondern aus anderen Strukturen freigesetzt worden waren, die durch die Injektion der GST-C oder GST-CA aufgelöst wurden. In Übereinstimmung mit dieser Erklärung belegte die Fluoreszenzmessung, dass sich der Gehalt an zellulärem polymerisierten Aktin nach GST-CA Injektion nicht signifikant verändert hatte.



WASp Konstrukt	Aktin Bindung	Arp2/3 Komplex Bindung	Arp2/3 Komplex Aktivierung <i>in vitro</i>	Arp2/3 Komplex "Priming"	Aktin-Aggregation in Zellen	Zelluläres WASp in Aktin-Aggregaten	Zellulärer Arp2/3 Komplex in Aktin-Aggregaten
VCA	+	+	+	n.b.	+	+	+
VC	+	-	+	n.b.	+	-	+
CA	+	+	-	+	+	+	+
V	+	-	- (essentiell)	n.b.	-	-	-
C	+	- (trägt bei)	- (essentiell)	n.b.	+ (wenig)	n.b.	n.b.
A	- (trägt bei)	+	-	+	-	-	-
A/W500S	n.b.	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 4.1. Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen der WASp C-terminalen Regionen**

“+“ bedeutet, dass das bezeichnete Konstrukt zu der über den Spalten vermerkten Aktion selbstständig in der Lage und dafür alleine ausreichend ist. “-“ dass das Konstrukt diese Aktion nicht induziert. “Trägt bei“ bedeutet, dass alleine das Konstrukt nicht zu der betreffenden Aktion in der Lage ist, es aber zur entsprechenden Aktion beiträgt, wenn es mit anderen WASp Regionen kovalent verknüpft ist. “Essentiell“ bedeutet, dass das entsprechende Konstrukt für diese Aktion unverzichtbar ist und dafür in kovalenter Verknüpfung mit einer anderen WASp Region vorliegen muss. “N.b.“ steht für nicht bestimmt. Aktin Bindung wurde in Anisotropie Messungen und/oder “Pulldown“ Versuchen bestimmt, ebenso die Arp2/3 Komplex Bindung. Die zellulären Effekte wurden durch Mikroinjektion der betreffenden Konstrukte untersucht.

In Tabelle 4.1. sind schematisch die verschiedenen Funktionen der WASp C-terminalen Regionen zusammengefasst. Alle Ergebnisse wurden entweder neu in diesen Studien gewonnen oder bestätigen in nahem zeitlichen Abstand zu diesen Studien publizierte Daten. Einzig in Bezug auf die C und CA Region finden sich in der Literatur etwas divergente Ergebnisse (Marchand *et al.*, 2001). In der zitierten Arbeit wurde beschrieben, dass die WASp-CA Region Arp2/3 Komplex sehr schwach aktivieren kann. In unseren Messungen war dies jedoch nicht zu wiederholen. Auch wurde bei Marchand *et al.*, 2001 beschrieben, dass die WASp-C Region Aktin nicht binden kann. In unseren “Pulldown“ Versuchen konnte die GST-C Region von WASp aber eindeutig Aktin aus Makrophagenlysaten binden. Die C Konstrukte, die bei Marchand *et al.*, 2001 verwendet wurden sind aber von den in dieser Studie verwendeten in zweifacher Hinsicht unterschiedlich. Zum einen war unser C Konstrukt ca. 10 Aminosäuren länger und umfasste also im Gegensatz zu dem bei Marchand *et al.*, 2001 beschriebenen die gesamte C Region. Zum andern war unser Konstrukt an GST gekoppelt und könnte so potentiell in einer anderen sterischen Konformation vorliegen.

#### 4.1.3. Die VCA Domänen der WASp-Familie Proteine zeigen unterschiedliche Aktivität

Die zur WASp-VCA Domäne gewonnenen Daten sind nicht direkt auf seine Homologen WAVE/Scar und N-WASP übertragbar. WASp-Familie Proteine aktivieren Arp2/3 Komplex unterschiedlich stark: WAVE-VCA ist der schwächste Nukleations-Aktivator, während WASp- und N-WASP-VCA die Nukleation 16-bzw. 70-fach stärker aktivieren (Zalevsky *et al.*, 2001b). Die stärkere Nukleations-Aktivierung der N-WASP-VCA könnte auf das Vorhandensein von zwei V Regionen im C-Terminus zurückzuführen sein (Yamaguchi *et al.*, 2000) oder auf eine bessere Arp2/3 Komplex Aktivierung durch die höhere Anzahl von sauren Aminosäuren im N-WASP Molekül (18 saure Aminosäuren im C-Terminus) im Vergleich zu WASp (13) und WAVE (9) (Zalevsky *et al.*, 2001b). In letztgenannten Nukleationsmodell geht man davon aus, dass die stärkere Nukleations-Aktivierung von WASp-VCA und N-WASP-VCA im Vergleich zu WAVE-VCA zum Teil durch ein Motiv von drei sauren Aminosäuren induziert wird, welches in der WASp-A und N-WASP-A nicht aber in der WAVE-A zu finden ist (Zalevsky *et al.*, 2001b).

Unsere Studien belegen die Unabdingbarkeit der WASp-VC Region bei der Aktivierung der Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation. Auch ein N-WASP Konstrukt, bei dem die A Region deletiert wurde, vermag die Aktin Nukleation noch zu aktivieren. Dies wurde auf eine Bindung von Arp2/3 Komplex an die WH1 Domäne zurückgeführt (Suetsugu *et al.*, 2001). Wir können nicht ausschließen, dass auch die WASp-WH1 Domäne Arp2/3 Komplex binden kann. In unseren Studien war dies aber durch Verwendung der isolierten VC Region ausgeschlossen. Im Gegensatz zu WASp-VC und N-WASP-VC aktiviert die WAVE/Scar-VC Region die Arp2/3 Komplex-abhängige Aktin Nukleation *in vitro* nicht (Sasaki *et al.*, 2000). WASp-GBD Konstrukte, die WASp-VCA binden, inhibieren die Filament Bildung durch WASp-VCA, aber nicht die durch WAVE/Scar-VCA (Higgs und Pollard, 2000). Dies ist ein weiterer Hinweis auf deutliche Unterschiede zwischen WASp und N-WASP auf der einen und WAVE/Scar Proteine auf der anderen Seite.

Die C-Termini von WASp, N-WASP und WAVE/Scar sind also funktionell unterschiedlich und tatsächlich wird spekuliert, dass WAVE/Scar-VC auch Arp2/3 Komplex-unabhängige Signalwege zur Nukleations-Aktivierung benutzen könnte (Sasaki *et al.*, 2000). WASp-VC wirkt, wie in diesen Studien gezeigt, über einen Arp2/3 Komplex-abhängigen Weg. Dies schließt natürlich nicht aus, dass es auch für WASp-VC weitere, Arp2/3 Komplex-unabhängige Wege geben könnte. Da jedoch Arp2/3 Komplex mit den durch WASp GST-VC

Injektion ausgelösten Klumpen kolokalisierte, scheint der Arp2/3 Komplex-abhängige Signalweg für dieses Molekül der Hauptmechanismus der Nukleations-Aktivierung zu sein.

#### **4.1.4. Interaktionen der A Regionen von WASp, N-WASP und WAVE/Scar mit Arp2/3 Komplex**

Um die Funktion der A Region von WASp-Familie Proteinen bei der Arp2/3 Komplex Bindung und Aktivierung genauer zu untersuchen, führten wir zuerst einen Vergleich der Arp2/3 Komplex Bindung durch. WASp GST-A ist in der Lage, Arp2/3 Komplex aus Makrophagenlysaten zu binden. Eine sukzessive N-terminale Verkürzung von WASp-A zeigte, dass die vier N-terminalen Aminosäuren (AS 488-491) für diese Interaktion essentiell sind. GST-A11 war das kürzeste Konstrukt, das noch eine Interaktion mit Arp2/3 Komplex im GST-“Pull-down“ Versuch zeigte. Zudem wurde nach Mutation der Aminosäure W 500 zu S (WASP-A/W500S) die Bindung an Arp2/3 Komplex fast vollständig aufgehoben (Tabelle 4.1.). Dies war zuvor schon für die VCA Region von WASp gezeigt worden (Marchand *et al.*, 2001).

Die Homologie zwischen WASp und N-WASP beträgt 50% (Paunola *et al.*, 2001), allerdings sind ihre A Regionen weitgehend konserviert (elf identische Aminosäuren) und sie zeigten im “Pull-down“ Versuch vergleichbare Arp2/3 Komplex Bindungseigenschaften. Die WAVE-A Region unterscheidet sich von den beiden zuvor beschriebenen Azidischen Regionen jedoch deutlich (sieben homologe Aminosäuren zwischen WASp-A und WAVE-A). Auch fehlt der WAVE-A ein Insert von drei Aminosäuren, welches in der WASp-A und N-WASP-A vorhanden ist und für die stärkere Nukleations-Aktivierung der beiden letztgenannten Konstrukte verantwortlich sein soll (vgl. Abschnitt 4.1.3.; Zalevsky *et al.*, 2001b). WAVE-A ist zwar notwendig für die Arp2/3 Komplex Bindung (Machesky *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2000) aber offensichtlich nicht ausreichend für die Arp2/3 Komplex Bindung *in vitro*. Die vollständigen VCA Domänen von WASp, N-WASP und WAVE weisen hingegen ähnliche Bindungsaffinitäten für Arp2/3 Komplex auf (Zalevsky *et al.*, 2001a).

#### 4.1.5. GST-A Konstrukte führen zum “Priming“ von Arp2/3 Komplex

Die A Regionen von WASp und N-WASP stellen also hochaffine Bindungsstellen für Arp2/3 Komplex dar. Allerdings ist ihre Aktivität nicht darauf beschränkt, wie im Folgenden erläutert wird. So führte Koinjektion von WASp-A oder N-WASP-A Konstrukten mit einer aktiven GTPase Mutante, V12CDC42 oder V12Rac, zur synergistischen Bildung von Filopodien bzw. Lamellipodien in den injizierten Zellen. Dies war auch der Fall, wenn beide Komponenten in subaktiven Konzentrationen vorlagen. Die WASp und N-WASP GST-A Regionen waren bei diesem Effekt austauschbar. Konstrukte, welche eine geringere Arp2/3 Komplex Bindung aufwiesen, wie GST-A13, waren bei der Induktion dieser Aktin-Strukturen weitaus weniger effektiv als GST-A. Das GST-CA Konstrukt, das Arp2/3 Komplex mit einer zehnfach höheren Affinität bindet als GST-A, war bei der Induktion von Filopodien oder Lamellipodien weitaus effektiver als die kürzere GST-A. Der synergistische Effekt zwischen aktiven GTPase Mutanten und A Konstrukten der WASp-Familie Proteine korrelierte also direkt mit der Fähigkeit der A Konstrukte, Arp2/3 Komplex zu binden (Tabelle 4.1.). Arp2/3 Komplex Bindung ist damit eine unabdingbare Voraussetzung für die beschriebenen Effekte, was auch durch seine Akkumulation in den induzierten Strukturen deutlich wird. Die A Regionen von WASp und N-WASP sind also nicht nur hochaffine Bindungsstellen für Arp2/3 Komplex sondern führen auch zu einer erhöhten Sensibilität des Komplexes gegenüber GTPase Signalen. Ein Erklärungsmodell ist die Auslösung eines “Priming“- (Sensibilisierungs-) Schrittes am Arp2/3 Komplex, der nicht zu seiner vollständigen Aktivierung führt. Nach vollständiger Aktivierung des Arp2/3 Komplexes kam es so zur zellulären Aktin Polymerisation. Über einen solchen Schritt war zuvor schon spekuliert worden (Marchand *et al.*, 2001). Unsere Ergebnisse geben den ersten direkten Hinweis dafür, dass dieser Zwischenaktivierungsschritt tatsächlich existiert.

In Abbildung 5.1. sind die Funktionen der C-terminalen Regionen von WASp noch einmal schematisch zusammengefasst. Die in diesen Studien neu hinzugewonnenen Erkenntnisse über die Funktion der VCA Region sind gesondert gekennzeichnet.

#### **4.1.6. Effekt der C-terminalen WASp Konstrukte auf Podosomen, Filopodien und Lamellipodien**

Podosomen enthalten polymerisiertes Aktin, Arp2/3 Komplex und WASp. Bei Patienten, die an Wiskott-Aldrich Syndrom leiden, also eine Mutation im WASp Gen besitzen, fehlen den Makrophagen die Podosomen (Linder *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, dass ihre Ausbildung von der Aktivierung von WASp und einer korrekten Lokalisation von Arp2/3 Komplex abhängig ist (unsere Ergebnisse). Die Injektion von GST-VCA, GST-VC, GST-CA oder GST-A Konstrukten von WASp führt zur Deassemblierung von Podosomen. Es ist naheliegend, dass die Injektion dieser Konstrukte Podosomen dadurch auflöst, dass sie den endogenen Arp2/3 Komplex oder podosomales WASp dislozieren. Diese Dislokation kann entweder durch eine Bindung des entsprechenden Konstrukts an Arp2/3 Komplex (unsere Studien) oder Verdrängung von Arp2/3 Komplex oder WASp von einem physiologischen Bindungspartner stattfinden (Linder *et al.*, 1999). In beiden Fällen kommt es durch die injizierten Konstrukte zu einer Dislokation von WASp und Arp2/3 Komplex aus ihrer Lokalisation in den Podosomen. Ähnliche Effekte wurden nach Injektion/Überexpression von WASp/Scar-VCA in anderen Zellen beobachtet (Machesky *et al.*, 1999; Machesky und Insall, 1998). Dieses Konzept wird jedoch durch die neu vorliegenden Daten komplexer, da einige der verwendeten Konstrukte (GST-VCA, GST-VC) selbst Arp2/3 Komplex aktivieren. Da diesen Konstrukten aber die für die intrazelluläre WASp Lokalisation wichtigen N-terminalen Domänen fehlen (Übersicht bei Higgs und Pollard, 1999; Miki und Takenawa, 2003) können sie keine gerichtete Aktin Nukleation, wie sie zum Aufbau von Podosomen notwendig ist, durchführen.

Mikroinjektion von GST-A in hoher Konzentration führte zur Auflösung von Podosomen, aber nicht zur Ausbildung von Aktin-Klumpen. Eine vollständige Aktivierung des Arp2/3 Komplexes konnte durch die A Region nicht erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass die Auflösung von Podosomen auf jeden Fall bei der GST-A Injektion durch eine Sequestrierung des Arp2/3 Komplexes zustande kam und nicht durch seine Aktivierung.

Die WASp-A Region konnte aber ein "Priming" des Arp2/3 Komplexes auslösen. Allerdings scheint der so voraktivierte Arp2/3 Komplex nicht für alle Signalwege gleich empfänglich zu sein. So scheinen die Signalwege der Podosomen-Regulation und der Filopodien- und Lamellipodien-Bildung eindeutig unterschiedlich zu sein. Die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien geht in mikroinjizierten Zellen oft mit einem Verlust der Podosomen einher, welche durch WASp reguliert werden (Linder *et al.*, 1999). Arp2/3 Komplex, der an die A

Region von WASp-Famile Proteinen gebunden und durch diese “geprimt“ ist, wird offenbar nicht in Podosomen eingebaut. Eine spezifische Umverteilung von WASp in den injizierten Zellen ließ sich nicht nachweisen.

Durch GTPase gesteuerten Signale kann der “geprimte“ Arp2/3 Komplex aber zur Filopodien- und Lamellipodien-Bildung verwendet werden. Es wäre möglich, dass die dafür benötigten Signale über den CDC42-IRSp53-Mena Weg laufen, von dem gezeigt wurde, dass er für die Filopodien-Bildung in Swiss3T3 Zellen wichtig ist (Krugmann *et al.*, 2001). Auch bei der Ausbildung von Lamellipodien könnte diese Regulations-Kaskade von Bedeutung sein (Nakagawa *et al.*, 2001). N-WASP und WAVE ließen sich in den durch Koinjektion induzierten Filopodien bzw. Lamellipodien nachweisen. Das deutet darauf hin, dass die “klassischen“ Signalwege auch in diesen Versuchen für die Ausbildung von Filopodien (CDC42-N-WASP-Arp2/3) und Lamellipodien (Rac-WAVE-Arp2/3) von Bedeutung waren. Dies schließt natürlich nicht aus, dass gleichzeitig oder unter anderen Bedingungen auch IRSp53 und Mena für die Ausbildung spezialisierter Aktin-Strukturen notwendig sind.

## **4.2. Regulation der Aktin Nukleation in Podosomen durch WASp-Polyprolin Domäne und Mikrotubuli**

### **4.2.1. Abhängigkeit der Podosomen-Bildung von intakten Mikrotubuli**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die aktinreichen podosomalen Adhäsionsstrukturen zu Mikrotubuli in einem engen räumlichen und auch funktionellen Verhältnis stehen. Mikrotubuli enden meist in der Peripherie der Zelle, wo auch die Podosomen lokalisiert sind. In manchen Fällen schienen Mikrotubuli direkt an Podosomen zu enden. Schon eine vorangegangene Arbeit in Osteoklasten hatte gezeigt, dass die Deassemblierung von Mikrotubuli zu einer ungeordneten Umverteilung der Podosomen führte (Babb *et al.*, 1997). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nicht nur die Orientierung, sondern auch die Ausbildung von Podosomen in primären Monozyten als auch Makrophagen an ein intaktes Tubulin-Zytoskelett gebunden ist. Frisch isolierte Monozyten konnten nach der Behandlung mit Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen keine Podosomen mehr ausbilden. Erst nach Auswaschen der Substanz kam es zur regelhaften Ausbildung von Podosomen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit reifen, bereits adhärenen Zellen erhalten, in denen Podosomen einer permanenten Dynamik unterliegen. Ein intaktes Tubulin-Zytoskelett ist also für beide

beschriebenen Prozesse notwendig: die initiale Podosomen-Ausbildung nach Isolierung der Monozyten aus dem peripheren Blut und die Neubildung von Podosomen in reifen Makrophagen.

Versuche mit dem Mikrotubuli Stabilisator Taxol zeigten weiterhin, dass für effiziente Podosomen-Bildung nicht nur intakte Mikrotubuli sondern auch eine funktionierende Mikrotubuli Dynamik notwendig sind. Diese Beobachtung steht in Einklang mit anderen Studie, wonach Taxol Behandlung die gerichtete Zell-Migration verhindert (Dunn *et al.*, 1997).

Es wurde bereits gezeigt, dass die Mikrotubuli Depolymerisierung oder das Verkürzen von Mikrotubuli zu einer Aktivierung der kleinen GTPase Rho führt. Dies erfolgt wahrscheinlich über eine Freisetzung von Mikrotubuli-gebundenen GEFs ("Guanine Nucleotid Exchange Factor"; siehe Abschnitt 1.2.3.). Die Aktivierung von Rho führt in den meisten Zellen zu einer Kontraktion (Kolodney und Elson, 1995; Chrznowska-Wodnicka und Burridge, 1996; Übersicht bei Waterman-Storer und Salmon, 1999). Dieses Phänomen kann auch in primären humanen Makrophagen beobachtet werden. Behandlung mit Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen führte zu einer Reduktion der Adhäsionsfläche und bei manchen Zellen auch zu Ausbildung kleiner Retraktionsfasern, je nach Dauer und Konzentration des einwirkenden Stoffes.

#### **4.2.2. Molekulare Mechanismen der Podosomen-Beeinflussung durch Mikrotubuli**

Um die Abhängigkeit der Podosomen-Bildung von intakten Mikrotubuli zu erklären, wurden zwei Beobachtungen herangezogen: 1) WASp ist in Podosomen lokalisiert und dient ihrer Regulation (Linder *et al.*, 1999) und 2) WASp kann mit seiner Polyprolin Domäne via CIP4 an Mikrotubuli binden (Tian *et al.*, 2000) (Abb.5.2.). In Mikroinjektionsversuchen konnten wir zeigen, dass die Injektion der WASp-Polyprolin Domäne die Wiederausbildung von Podosomen verhinderte. Dieser Effekt beruhte nicht auf einer morphologischen Schädigung der Mikrotubuli und war spezifisch für die Polyprolin Domäne von WASp. Es ist also davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt auf einer Verdrängung des endogenen WASp von den Mikrotubuli beruht, so dass dieses nicht mehr an Orte der Podosomen-Bildung translozieren kann. Dieses Modell ist in Abbildung 5.2. schematisch dargestellt.

Die WASp-Polyprolin Domäne bindet außer an CIP4 noch an andere intrazelluläre Proteine, so zum Beispiel die Tyrosinkinasen der Src Familie (Banin *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997) und

auch Adapterproteine wie Grb2 (Carlier *et al.*, 2000) und Nck (Rivero *et al.*, 1995; Cory *et al.*, 1996). Die meisten Bindungspartner von WASp üben allerdings nicht essentielle sondern modulatorische Funktionen auf das Aktin-Zytoskelett aus (GRb2: Carlier *et al.*, 2000). So ist davon auszugehen, dass diese Bindungspartner nicht entscheidend an der Bildung von Podosomen beteiligt sind, sondern dass der von uns beobachtete Effekt auf einer Unterdrückung der Bindung von endogenem Vollängen-WASp an Mikrotubuli besteht.

Diese Modellvorstellung wird durch folgenden Sachverhalt weiter untermauert: wenn man CIP4 Deletions-Mutanten, denen entweder die WASp- oder die Mikrotubuli-bindende Region fehlt, als GST-Fusionsproteine in primäre humane Makrophagen injizierte, wurde ebenfalls die Ausbildung von Podosomen verhindert. Dieser Effekt war vergleichbar mit der Injektion der WASp-Polyprolin Domäne.

CIP4 wurde als ein Bindungspartner für CDC42 identifiziert (Aspenström, 1997), aber eine CDC42 Bindung ist nicht notwendig für die Bindung von WASp via CIP4 an Mikrotubuli (Tian *et al.*, 2000). Es ist deshalb noch nicht klar, ob eine Aktivitätsänderung von CDC42 für den Transport von WASp an Mikrotubuli notwendig ist.

WASp ist nicht der erste Regulator des Aktin-Zytoskeletts, für den ein Transport an Mikrotubuli postuliert wird. So wurde dies bereits für die kleine GTPase Rac (Best *et al.*, 1996) oder den Rac/Rho Guanosin Austauschfaktor Vav beschrieben (Huby *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1999).

#### **4.2.3. Unterschiede zwischen Podosomen und fokalen Adhäsionen**

In vielen Zellen kommt es nach der Depolymerisierung der Mikrotubuli zu einer Zunahme der Zahl und Größe fokaler Adhäsionen (Loyed *et al.*, 1977; Kaverina *et al.*, 1998). Dies ist auch in Makrophagen der Fall. Dadurch wird ein grundlegender Unterschied zwischen fokalen Adhäsionen und Podosomen verdeutlicht. Podosomen werden durch die Depolymerisierung der Mikrotubuli in ihrer Ausbildung behindert, während die Ausbildung von fokalen Adhäsionen begünstigt wird.

Auch in ihrer Halbwertszeit unterscheiden sich fokale Adhäsionen und Podosomen. Während Podosomen sehr dynamische Strukturen mit einer Halbwertszeit von 2-12 Minuten sind, so sind fokale Adhäsionen viel stabiler mit einer Halbwertszeit von über 30 min (Kanehisa *et al.*, 1990).



Noch ein anderer wichtiger Punkt weist auf den Unterschied zwischen den beiden genannten Adhäsionsstrukturen hin: ihre Sensibilität bezüglich RGD- bzw. RGDS-Peptiden ist verschieden. So wird durch die Blockierung der extrazellulären Integrin-Domäne die Ausbildung von fokalen Adhäsionen verhindert, die Neubildung von Podosomen wird aber nur wenig zeitlich verzögert, und auf bereits gebildete Podosomen zeigt die Behandlung mit den Peptiden (in der von uns verwandten Konzentration von 1 mM) keinen Einfluss. Es ist allerdings erwähnenswert, dass auch Podosomen Integrin-“Cluster“ enthalten, vor allem solche mit  $\beta 1$ -Kette (Marchisio *et al.*, 1988). Mit den uns zur Verfügung stehenden Antikörpern konnten wir nur  $\alpha V\beta 3$  Integrine sicher in Podosomen nachweisen. Dies wurde in einer anderen Studie mit Osteoklasten-ähnlichen Zellen bestätigt (Paff und Jurdic, 2001). Auch die Verwendung von höheren Konzentrationen an RGD- oder RGDS-Peptid könnten hier weitere Ergebnisse bringen. Auf diesem Gebiet sind sicher noch weitere Untersuchungen notwendig, da davon auszugehen ist, dass die Bindung von Integrinen an extrazelluläre Matrix auch eine Rolle in der Podosomen-Bildung und Makrophagen-Adhäsion spielt. Diese Funktion scheint aber verschieden von der Bedeutung der Integrine in fokalen Adhäsionen zu sein.

#### **4.2.4. Beeinflussung der Mikrotubuli durch das Aktin-Zytoskelett**

Es stellte sich nun die Frage, ob die funktionelle Beziehung zwischen Aktin-Zytoskelett (im untersuchten Fall den Podosomen) und Tubulin-Zytoskelett wechselseitig war. Wir suchten deshalb nach Einflüssen in umgekehrter Richtung: vom Aktin-Zytoskelett auf die Mikrotubuli. Tatsächlich fand sich in WAS Makrophagen, in denen Podosomen fehlen, häufiger als in gesunden Zellen ein deformiertes Tubulin-Zytoskelett. Um herauszufinden, ob diese Unregelmäßigkeiten in der Mikrotubuli Organisation auf dem Fehlen der Podosomen, oder sterischen Veränderungen durch unregelmäßige Zellform und auftretende Aktin-Klumpen beruhten, wurden gesunde Makrophagen mit der GST-VC Region von WASp injiziert. Wie bereits besprochen, kam es nach Injektion der GST-VC Region in der Mehrzahl der injizierten Zellen zum Verschwinden der Podosomen und, je nach Inkubationslänge und Menge des injizierten Proteins, auch zum Auftreten von Aktin-Klumpen im Zytoplasma. Makrophagen, in denen es zur Ausbildung von Aktin-Klumpen im Zytoplasma gekommen war, zeigten oft eine ungewöhnliche Verteilung der Mikrotubuli. Auf der anderen Seite war in solchen Zellen, in denen nur die Podosomen zerstört worden waren, das Tubulin-Zytoskelett

völlig unauffällig. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass auch Zellen, deren Podosome mit Cytochalasin D oder PP2 zerstört wurden, ein unauffälliges Tubulin-Zytoskelett aufwiesen. Mikrotubuli interagieren offensichtlich in den Podosome mit dem Aktin-Zytoskelett. Die korrekte Ausbildung der Mikrotubuli scheint aber primär von Podosome unabhängig zu sein.

### **4.3. “Über den Zellrand geschaut“ - erste Analysen zur Funktion von WASp bei der Regulation der Aktin Nukleation in mehrzelligen Organismen**

Wie die vorliegenden Studien zeigen, ist die Untersuchung der WASp- und Arp2/3 Komplex-abhängigen Aktin Nukleation *in vitro* eine gute Möglichkeit, spezifische Funktionsweisen dieser Proteindomänen aufzuklären. Bei der Verwendung von Zellsystemen wird zwar ein physiologischeres Umfeld erreicht, allerdings lässt sich auch der Einfluss unbekannter Faktoren nicht mehr so gut kontrollieren. Deshalb haben wir für unsere Untersuchungen eine Kombination aus *in vitro* Experimenten und Versuchen mit primären humanen Makrophagen gewählt. In einer weiteren Stufe der Komplexität werden inzwischen auch vermehrt Untersuchungen zur Funktion von WASp-Familie Proteinen an mehrzelligen Organismen durchgeführt.

WASp<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen Phänotyp vergleichbar mit dem humanen Wiskott-Aldrich Syndrom (Snapper *et al.*, 1998), während N-WASP<sup>-/-</sup> Mäuse nicht lebensfähig sind (Snapper *et al.*, 2001; Lommel *et al.*, 2001). Dies wird verständlich, wenn man bedenkt dass N-WASP in allen Geweben exprimiert wird, während WASp nur in hämatopoetischen Geweben vorkommt. Die Deletion des Gens der WAVE1 Isoform führte bei Mäusen zu neurologischen Störungen in Bezug auf Lernen und Gedächtnis (Soderling *et al.*, 2003). WAVE2<sup>-/-</sup> Mäuse starben noch im Embryostadium an Blutungen (Yamazaki *et al.*, 2003). Die Mäuse wiesen Defekte bei der Angiogenese auf. Die Autoren postulieren, dass WAVE2 für die Zell-Wanderung während der frühen Angiogenese essentiell ist (Yamazaki *et al.*, 2003).

Auch in *Drosophila* wurden Deletionsexperimente durchgeführt. Bei diesen Fliegen ist nur ein Gen für WASp und eines für WAVE bekannt. Deletion des WASp oder WAVE Gens führte zu definierten Entwicklungsstörungen (Ben-Yaacov *et al.*, 2001; Zallen *et al.*, 2002). Das Aktin-Zytoskelett dieser Zellen war desorganisiert. Der Phänotyp der *Drosophila* Fliegen mit Deletionen im Gen für Arp2/3 Untereinheiten glich der Summe der Defekte, die durch

WASp oder WAVE Gendeletion beobachtet wurden (Hudson und Cooley, 2002; Übersicht bei Miller, 2002). Dies deutet darauf hin, dass auch in der Entwicklung von *Drosophila* die Aktin Nukleation über WASp-Familie Proteine und Arp2/3 Komplex reguliert wird. Es zeigen sich noch weitere Parallelen: wurde in WASp<sup>-/-</sup> *Drosophila* Stämmen ein WASp Gen exprimiert, bei dem die A Region fehlte, so konnten einige Entwicklungsabnormalitäten vermieden werden (Tal *et al.*, 2002). Sowohl bei der Entwicklung mehrzelliger Organismen (Tal *et al.*, 2002), bei Experimenten in einzelnen Zellen (vorliegende Studie), aber auch bei *in vitro* Versuchen (vorliegende Studie) ist die C Region offenbar für die WASp Funktion essentiell. Allerdings wird das dem humanen WASp homologe Protein in *Drosophila* nicht über CDC42 und PIP reguliert (Tal *et al.*, 2002). Wie bei Versuchen in Zellsysteme bereits beschreiben, so finden sich auch bei *Drosophila* Arp2/3 Komplex-unabhängige Wege der Aktin Nukleation (Hudson und Cooley, 2002).

Diese Beispiele unterstreichen die Bedeutung der WASp-abhängigen Aktin Nukleation in der einzelnen Zelle einerseits und bei der Entwicklung und Funktion eines komplexen mehrzelligen Organismus andererseits.

**Alle gute Literatur hat einen Anfang, einen Mittelteil  
und einen Schluss**

Aristoteles (384-322 v. Chr.)  
griechischer Philosoph, Logiker und Naturforscher, Mitglied der Akademie Platons,  
Erzieher von Alexander dem Großen

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

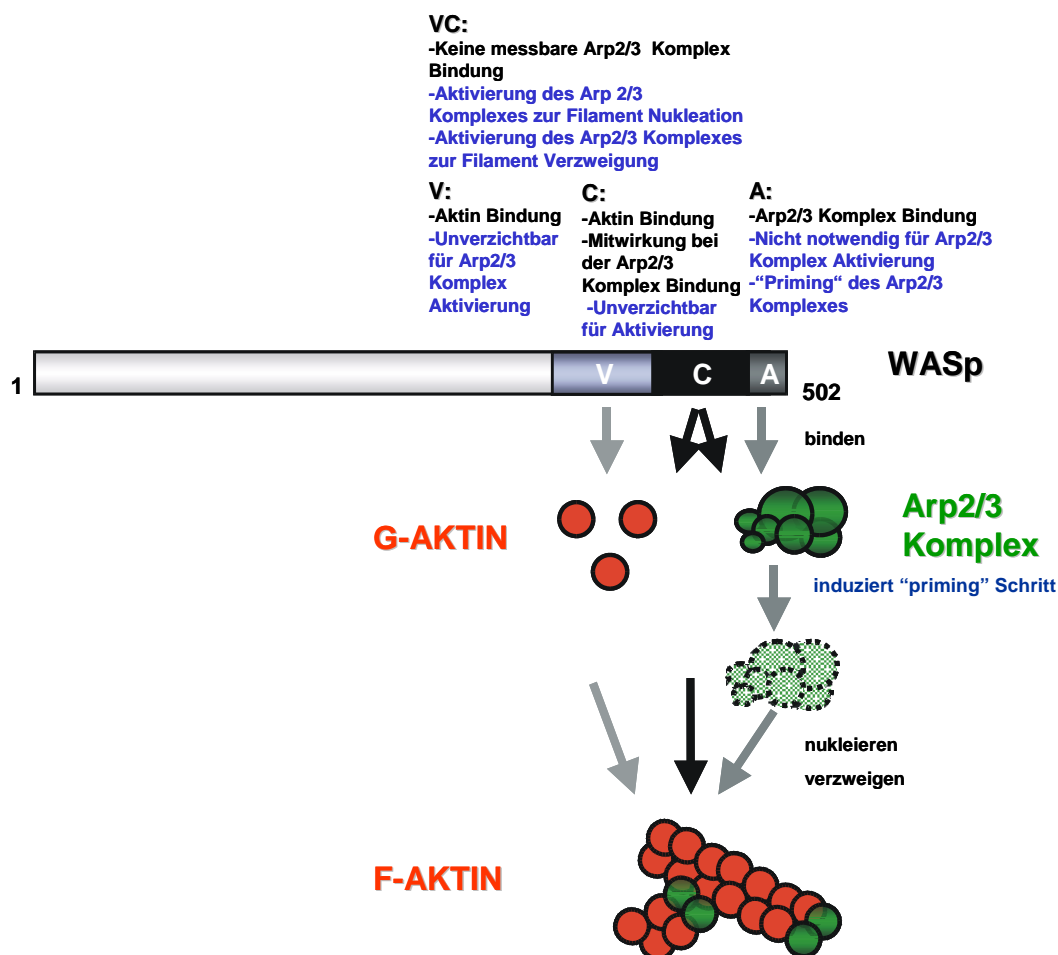
Die Polymerisation von monomerem G-Aktin zu filamentösem F-Aktin, die Organisation von Aktin-Filamenten zu spezifischen Zytoskelettstrukturen, sowie die F-Aktin Depolymerisation stellen in ihrem dynamischen Zusammenspiel die Triebkraft vieler zellulärer Bewegungsvorgänge dar. Dies sind u.a. Zell-Polarisation, Zell-Migration, Zell-Teilung, Zell-Zell-Interaktionen, Phagozytose und intrazellulärer Vesikeltransport. Das Verständnis der molekularen Grundlagen der Aktin Organisation hat 1999 einen entscheidenden Fortschritt gemacht: damals wurde entdeckt, dass der sieben Untereinheiten umfassende Arp2/3 Komplex nach Aktivierung durch Proteine der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein- (WASp-) Familie Aktin-Filamente *de novo* polymerisieren kann.

Die 1999/2000 begonnenen Experimente für diese Dissertationsarbeit hatten zum Ziel, den Mechanismus der WASp-abhängigen Aktin Nukleation *in vitro* und in humanen Makrophagen genauer zu untersuchen. Einerseits sollten die Regionen von WASp genauer charakterisiert werden, die für die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes verantwortlich sind. Andererseits sollte die Bedeutung von WASp und Arp2/3 Komplex bei der Aktin Nukleation in spezialisierten Adhäsionsstrukturen von Makrophagen, sogenannten Podosomen, geklärt werden. Podosomen sind essentiell für Adhäsion, Migration und vermutlich auch Gewebeinvasion von Makrophagen und ihnen verwandten Zellarten, aber sie finden sich auch in einer Vielzahl weiterer Zelltypen einschließlich metastasierender Tumorzellen. Die Bedeutung von Podosomen wird dadurch verdeutlicht, dass ihr Fehlen bei unter Wiskott-Aldrich Syndrom leidenden Patienten mit klinisch relevanten Immundefekten assoziiert ist. Daneben eignen sich Podosomen durch ihren hohen Gehalt an F-Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen, sowie aufgrund ihrer guten Manipulier- und Darstellbarkeit ideal als Modellstrukturen für die Erforschung lokaler Zytoskelett-Regulation und -Dynamik.

Zur Identifizierung der für die Aktin Nukleation minimal notwendigen WASp Regionen wurden verschiedene GST-Fusionskonstrukte der konstitutiv aktiven VCA ("Verprolin-like", "Central", "Acidic") Domäne hergestellt. Durch Anisotropie Messungen und in GST-"Pulldown" Versuchen wurde die Bindung von Arp2/3 Komplex und G-Aktin an die verschiedenen Konstrukte *in vitro* bestimmt. In einem zweiten Schritt wurde getestet, welche Regionen für die Arp2/3 Komplex Aktivierung notwendig sind. Dabei wurde GST-VC als die minimal notwendige Region für die Aktivierung der Aktin Nukleation identifiziert (Abb.5.1.). Durch mikroskopische Analyse von *in vitro* nukleierten Aktin-Filamenten stellten wir fest,

dass der durch GST-VC aktivierte Arp2/3 Komplex auch zur Ausbildung von Aktin-Filament Verzweigungen fähig ist (Abb.5.1.).

Die zellulären Effekte der VCA Konstrukte wurden mittels Mikroinjektion in primäre humane Makrophagen untersucht. Aktive Konstrukte führten zum Auftreten von prominenten Aktin-Aggregaten im Zytoplasma und zur Zerstörung von Podosomen. Das Ausmaß der zellulären Aktin Nukleation wurde durch Epifluoreszenzmessungen quantifiziert. Auch hierbei war GST-VC das kürzeste Konstrukt, das vermutlich durch Aktivierung von zellulärem Arp2/3 Komplex, zur Zunahme des Gehaltes an intrazellulärem polymerisiertem Aktin führte (diese Studien). Abbildung 5.1. zeigt eine schematische Darstellung der Funktion des C-Terminus von WASp, wobei die von uns bearbeiteten Funktionen in Blau dargestellt sind.

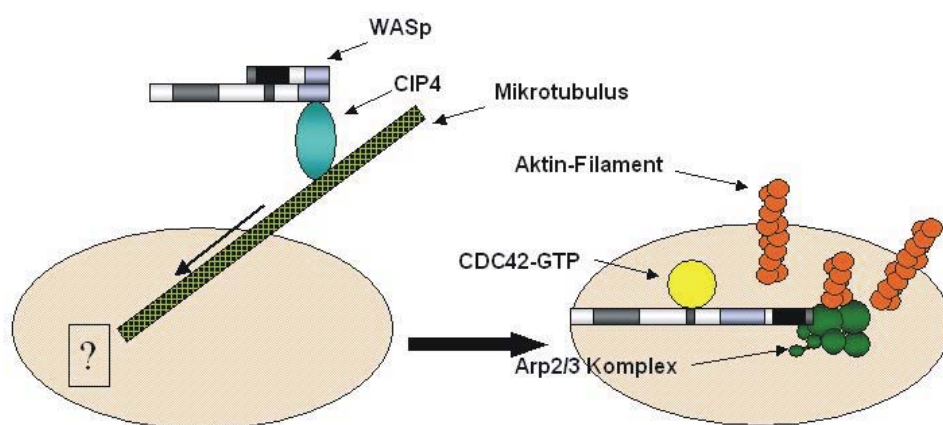


**Abb.5.1. Funktionen der verschiedenen WASp C-terminalen Regionen im Überblick.** Alle in dieser Arbeit beschriebenen eigenen Ergebnisse sind in Blau dargestellt.

Von WASp ist nur die VCA Domäne im Detail dargestellt: WH2/Verprolin-homologe Domäne (V), Zentrale Region (C) und eine Sequenz von sauren Aminosäuren (A) (Übersicht bei: Higgs und Pollard, 2001). Die V Region bindet Aktin. Die C Region trägt sowohl zur Bindung von Aktin-Monomeren als auch von Arp2/3 Komplex bei. Die VC Region ist die minimal notwendige Region zur Aktin Nukleations-Aktivierung und zur Ausbildung von Filament Verzweigungen. Die A Region ist nicht nur eine "High Affinity Binding Site" für Arp2/3 Komplex sondern kann den Komplex auch in einen voraktivierten Zustand versetzen, so dass er für GTPase Signale empfindlicher ist ("Priming").

Obwohl die WASp-A Region als hochaffine Arp2/3 Komplex Bindungsstelle beschrieben worden war (Machesky und Insall, 1998), ist sie für die Arp2/3 Komplex Aktivierung nicht essentiell (diese Studien). Um dieses Phänomen in unserem System zu verifizieren und weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Konstrukte der WASp-A Region, sowie auch seiner Homologen N-WASP und WAVE/Scar hergestellt. Durch Koinjektion von WASp-A oder N-WASP-A mit aktiven GTPasen konnte ein erster experimenteller Hinweis für eine “Priming“- (Sensibilisierungs-) Funktion der A Region am Arp2/3 Komplex gefunden werden (diese Studien) (Abb.5.1.). Dieser Schritt war zuvor bereits theoretisch postuliert worden (Marchand *et al.*, 2001).

Bei der Untersuchung der Aktin Nukleation und Organisation in Podosomen zeigte sich ein enger funktioneller Zusammenhang zwischen Aktin- und Tubulin-Zytoskelett. So konnte durch Depolymerisierung der Mikrotubuli in adhärierenden Monozyten die Ausbildung von Podosomen verhindert werden. Die Ausbildung von aktinfreien fokalen Adhäsionen wurde durch diese Behandlung nicht beeinflusst. Da bekannt war, dass WASp über seine Polyprolin Domäne an CIP4 (“CDC42 Interacting Protein“; Tian *et al.*, 2000) bindet und dieses wiederum mit Mikrotubuli assoziiert, wurde der Einfluss der isolierten WASp-Polyprolin Domäne, aber auch von CIP4 Deletions-Konstrukten, denen entweder die Mikrotubuli oder WASp Bindungsstelle fehlten, auf die Podosomen-Ausbildung untersucht.



**Abb.5.2. Modell der Regulation von Podosomen durch Mikrotubuli**

WASP bindet mit seiner Polyprolin Region (hellgrau) an CIP4 (blau). Es befindet sich in diesem Modell in seiner rückgefalteten, autoinhibierten Konformation. CIP4 bindet seinerseits an Mikrotubuli (grün/schwarz). Durch einen bislang unbekannten Stimulus kommt es zum Transport von WASp an Orte der Podosomen-Entstehung. Dort wird WASp durch Bindung von CDC42 (gelb) und eventuell auch PIP2 aktiviert und steht nun

für die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes (grün) zur Verfügung. Monomeres Aktin und Arp2/3 Komplex binden an die VCA Region von WASp und neue Filamente werden nukleiert. Es kommt zur Ausbildung eines dichten Aktin-Netzwerkes (rot).

Einem auf den so erhaltenen Ergebnissen basierendem Modell zufolge könnte WASp durch CIP4 an Mikrotubuli rekrutiert und anschließend via Mikrotubuli an Orte der Podosomen-Bildung transportiert werden. Dort könnte WASp dann zur Aktivierung von Arp2/3 Komplex und zur Nukleation von neuen Aktin-Filamenten führen (diese Studien). Abbildung 5.2. zeigt ein Modell der Interaktion von WASp über CIP4 mit Mikrotubuli und dessen mögliche Bedeutung bei der Regulation der Aktin Nukleation in Podosomen.



## **Progress lives from the exchange of knowledge**

Albert Einstein (1879-1955)

deutsch-amerikanischer Physiker (Relativitätstheorie), 1921 Nobelpreis für Physik

## **6. LITERATUR**

- Abo A.** (1998). Understanding the molecular basis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell. Mol. Life Sc.* **54**, 1145-1153.
- Adams, J.C.** (2001). Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 371-392.
- Addinall, S.G. and Holland, B.** (2002). The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* **318**, 219-236.
- Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M. and Weber, P.C.** (1997). Bacterial toxins block endothelial wound repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1623-1629.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1994). Molecular Biology of the Cell, *Garland Publishing*, 3rd ed. New York.
- Aldrich, R.A., Steinberg, A.G. and Campell, D.C.** (1954). Paediatric demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhoea. *Paediatrics* **12**, 133-139.
- Allen, W.E., Zicha, D., Ridley, A.J. and Jones, G.E.** (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* **141**, 1147-1157.
- Amann, K.J. and Pollard T.D.** (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* **3**, 306-310.
- Amos, L.A., van den Ent, F. and Löwe, J.** (2004). Structural/functional homology between the bacterial and eukaryotic cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 1-8.
- Apodaca, G.** (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**, 149-159.
- Aqel, N.M., Ball, R.Y., Waldmann, H. and Mitchinson, M.J.** (1984). Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **53**, 265-271.
- Aspenström, P.** (1997). A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **7**, 479-487.
- Babb, S.G., Matsudeira, P., Sato, M., Correia, I. and Lim, S.-S.** (1997). Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil. Cytoskel.* **37**, 308-325.
- Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A.G. and Notarangelo, L.D.** (1998). Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Immunol.* **161**, 1026-1033.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B. and Imhof, B.A.** (2000). Actin-dependant lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control directed cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 2999-3012.
- Banin, S., Truong, O., Katz, D.R., Waterfield, M.D., Brickell, P.M. and Gout, I.** (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol.* **6**, 70-75.
- Bear, J.E., Rawls, J.F. and Saxe, C.L. 3rd.** (1989). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J. Cell Biol.* **142**, 1325-1335.
- Ben-Yaacov, S., Le Borgne, R., Abramson, I., Schweisguth, F. and Schejter, E.D.** (2001). Wasp, the Drosophila Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. *J. Cell Biol.* **152**, 1-13.

- Bernier, G., Pool, M., Kilcup, M., Alföldi, J., De Repentigny, Y. and Kothary, R.** (2000). Acf7 (MACF) is an actin and microtubule linker protein whose expression predominates in neural, muscle, and lung development. *Dev. Dyn.* **219**, 216-225.
- Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A. and Geiger, B.** (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6**, 1279-1289.
- Best, A., Ahmed, S., Kozma, R. and Lim, L.** (1996). The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 3756-3762.
- Binks, M., Jones, G.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Katz, D.R. and Thrasher, A.J.** (1998). Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3259-3267.
- Blanchoin, L. and Pollard, T.D.** (1998). Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* **273**, 25106-15111.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D.** (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007-1010.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D. and Mullins, R.D.** (2000b). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodelling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273-1282.
- Bonder, E.M., Fishkind, D.J. and Mooseker, M.S.** (1983). Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* **34**, 491-501.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-253.
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, A.P., Machesky, L. and Jones, G.E.** (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.
- Carrier, M.-F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D.** (2000). Grb2 links signalling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein (N-WASP) with actin-related protein (Arp2/3) complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 21946-21952.
- Chen, W.T.** (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* **251**, 167-185.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K.** (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibres and focal adhesions. *J. Cell Biol.* **133**, 1403-1415.
- Cooper, J.A.** (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **105**, 1473-1478.
- Cooper, J.A., Walker, S.B. and Pollard, T.D.** (1983). Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerisation. *Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 253-262.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R. and Ridely, A.J.** (2002). Phosphorylation of the tyrosine 291 enhances the ability of WASP to stimulate actin polymerisation and filopodium formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 45115-45121.
- Cory, G.O., MacCarthy-Morrogh, M.L., Banin, S., Gout, I., Brickell, P.M., Levinsky, R.J., Kinnon, C. and Lovering, R.C.** (1996). Evidence that the Wiskott-Aldrich syndrome protein may be involved in lymphoid cell signalling pathways. *J. Immunol.* **157**, 3791-3795.
- Craig, S.W. and Chen, H.** (2003). Lamellipodia protrusion: moving interactions of vinculin and Arp2/3. *Curr. Biol.* **13**, 236-238.
- Craig, S.W. and Johnson, R.P.** (1996). Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 74-85.

- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J. and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5134–5138.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at the serine 16. *J. Biol. Chem.* **276**, 1677–1680.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A. and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell Biol.* **159**, 881–891.
- Derry, J.M., Kerns, J.A., Weinberg, K.I., Ochs, H.D., Volpini, V., Estivill, X., Walker, A.P. and Francke, U. (1995). WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1127–1135.
- Devriendt, K., Kim, A.S., Mathijs, G., Frints, S.G., Schwartz, M., Van Den Oord, J.J., Verhoef, G.E., Boogaerts, M.A., Fryns, J.P., You, D., Rosen, M.K. and Vandenberghe, P. (2001). Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat. Genet.* **27**, 313–317.
- DiNubile, M.J., Cassimeris, L., Joyce, M. and Zigmond, S.H. (1995). Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: the role of capping protein-beta 2. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1659–1671.
- Drees, B.L., Sundin, B., Brazeau, E., Caviston, J.P., Chen, G.C., Guo, W., Kozminski, K.G., Lau, M.W., Moskow, J.J., Tong, A., Schenkman, L.R., McKenzie, A. 3rd, Brennwald, P., Longtine, M., Bi, E., Chan, C., Novick, P., Boone, C., Pringle, J.R., Davis, T.N., Fields, S. and Drubin, D.G. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* **154**, 549–471.
- Dunn, G.A., Zicha, D. and Fraylich, P.E. (1997). Rapid, microtubule-dependent fluctuations of the cell margin. *J. Cell Sci.* **110**, 3091–3098.
- Dustin, P. (1984). Microtubules, 2nd edition, *Springer-Verlag*, New York.
- Eisenhauer, E.A. and Vermorken, J.B. (1998). The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* **55**, 5–30.
- Enomoto, T. (1996). Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibres and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* **21**, 317–326.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell* **106**, 489–498.
- Euteneuer, U. and Schliwa, M. (1984). Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* **310**, 58–61.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C. and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* **4**, 260–269.
- Evangelista, M., Zigmond, S. and Boone, C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* **116**, 2603–2611.
- Fabunmi, R.P., Sukhova, G.K., Sugiyama, S. and Libby, P. (1998). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ. Res.* **83**, 270–278.
- Falet, H., Hoffmeister, K.M., Neujahr, R. and Hartwig, J.H. (2002). Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp. *Blood* **100**, 2113–2122.
- Fernandez, J.A., Keshvara, L.M., Peters, J.D., Furlong, M.T., Harrison, M.L. and Geahlen, R.L. (1999). Phosphorylation- and activation-independent association of the tyrosine kinase Syk and the tyrosine kinase substrates Cbl and Vav with tubulin in B-cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 1401–1406.

- Flinn, H.M. and Ridley, A.J.** (1996). Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J. Cell Sci.* **109**, 1133-41.
- Fradelizi, J., Noireaux, V., Plastino, J., Menichi, B., Louvard, D., Sykes, C., Golsteyn, R.M. and Friederich, E.** (2001). ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity. *Nat. Cell Biol.* **3**, 699-707.
- Fuchs, E. and Cleveland, D.W.** (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **23**, 514-519.
- Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K.** (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* **272**, 29579-29583.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F. and Kaibuchi, K.** (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**, 873-885.
- Garfin, D.E.** (1990). One Dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **182**, 425-441.
- Gavazzi, I., Nermut, M.V. and Marchisio, P.C.** (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J. Cell Sci.* **94**, 85-99.
- Gelfand, V.I. and Bershadsky, A.D.** (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 93-116.
- Gerrity, R.G.** (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am. J. Pathol.* **103**, 181-190.
- Goode, B.L., Drubin, D.G. and Barnes, G.** (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 63-71.
- Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L. and Ahmed, S.** (2001). Cdc42HS facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J. Cell Biol.* **152**, 579-594.
- Hai, C-M., Hahne, P., Harrington, E.O. and Gimona, M.** (2002). Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodelling in A7r5 smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* **280**, 64-74.
- Hamel, E.** (1996). Antimitotic natural products and their interaction with Tubulin. *Med. Res. Rev.* **16**, 207-231.
- Hegyi, L., Hardwick, S.J., Siow, R.C.M. and Skepper, J.N.** (2001). Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* **10**, 27-42.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D.** (1999). Regulation of actin polymerisation by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 32531-32534.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D.** (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **150**, 1311-1320.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D.** (2001). Regulation of Aktin Filament network formation through Arp2/3 complex: Activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 649-676.
- Higgs, H.N., Blanchoin, L. and Pollard, T.D.** (1999). Influence of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) C terminus and Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212-15222.
- Hirokawa, N., Noda, Y. and Okada, Y.** (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 60-73.
- Houk, T.W.Jr. and Ue, K.** (1974). The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Anal. Biochem.* **62**, 66-74.

- Huby, R.D.J., Carlile, G.W. and Ley, S.C.** (1995). Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncogene Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 30241-30244.
- Hudson, A.M. and Cooley, L.** (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **156**, 677-687.
- Humphries, C.L., Balcer, H.I., D'Agostino, J.L., Winsor, B., Drubin, D.G., Barnes, G., Andrews, B.J. and Goode, B.L.** (2002). Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J. Cell Biol.* **159**, 993-1004.
- Hyams, J.F. and Lloyd, C.W.** (1993). Microtubules. *Wiley-Liss*, New York.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T. and Narumiya, S.** (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* **1**, 8-14.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M. and Imhof, B.A.** (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J. Cell Sci.* **113**, 921-933.
- Jones, G.E.** (2000). Cellular signalling in macrophage migration and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 593-602.
- Jones, G.E., Allen, W.E. and Ridely, A.J.** (1998). The Rho GTPases in macrophage mobility and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 593-602.
- Jones, G.E., Zicha, D., Dunn, G.A., Blundell, M. and Thrasher A.** (2002). Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 806-815.
- Kabsch, W. and Vandekerckhove, J.** (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 49-76.
- Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J.N., Aubin, J.E. and Takeuchi, H.** (1990). A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* **11**, 287-293.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V.** (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033-1043.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V.** (2002). Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *IJBCB* **34**, 746-761.
- Kaverina, I., Rottner, K. and Small, J.V.** (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J. Cell Biol.* **142**, 181-190.
- Kelleher, J.F., Atkinson, S.J. and Pollard, T.D.** (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* **131**, 385-97.
- Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F.S. and Parkman, R.** (1986). Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. **68**, 1329-1332.
- Killian, J.J. and Fidler, I.J.** (1994). Systemic targeting of liposome encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods* **4**, 273-279.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A. and Rosen, M.K.** (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151-158.
- Kolodney, M. and Elson, E.** (1995). Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10252-10256.
- Koonce, M.P., Euteneuer, U., McDonald, K.L., Menzel, D. and Schliwa, M.** (1986). Cytoskeletal architecture and motility in a giant freshwater amoeba, *Reticulomyxa*. *Cell Motil. Cytoskel.* **6**, 521-533.

- Krivit, W., Yunis, E. and White, J.G.** (1966). Platelet survival studies in Aldrich Syndrome. *Pediatrics* **37**, 339-343.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A.** (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr. Biol.* **11**, 1645-1655.
- Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A. and Kasbuchi, K.** (1996). Identification of IQGAP1 as a putative target for the small GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* **271**, 23363-23367.
- Labro, M.T.** (1998). Antibacterial agents—Phagocytes: new concepts for the old in immunomodulation. *Int. J. Antimicrob. Agents* **10**, 11-21.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **356**, 722-725.
- Langford, G.M.** (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 82-88.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369.
- Lee, J.C., Field, D.J. and Lee, L.L.** (1980). Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* **19**, 6209-6215.
- Li, F. and Higgs, H.N.** (2003). The mouse forming mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr. Biol.* **13**, 1335-1340.
- Li, R.** (1997). Bee, a yeast protein with homology to Wiskott-Aldrich syndrome protein is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **136**, 649-658.
- Linder, S. and Aepfelbacher, M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **1**, 376-385.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. and Aepfelbacher, M.** (1999). Wiskott-Aldrich Syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9648-9653.
- Linder, S., Wintergerst, U., Bernder-Götze, C., Schwarz, K., Pannicke, U. and Aepfelbacher, M.** (2003). Macrophages of patients with X-linked Thrombocytopenia display an attenuated Wiskott-Aldrich syndrome phenotype. *Imm. Cell Biol.* **81**, 130-136.
- Lloyd, C.W., Smith, C.G., Woods, A. and Reeds, D.A.** (1977). Mechanism of cellular adhesion. II. The interplay between adhesion, the cytoskeleton, and morphology in substrate-attached cell. *Exp. Cell Res.* **110**, 427-437.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J. and Kuhn, R.** (2001). Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* **2**, 850-857.
- Ma, X., Ehrhardt, D.W. and Margolin, W.** (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12998-13003.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein WASp regulate the actin cytoskeleton through Arp2/3. *Curr. Biol.* **8**, 1347-1356.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D.** (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity purification on profilin agarose. *J. Cell Biol.* **234**, 826-836.

- Machesky, L.M., Mullins, D.M., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E. and Pollard, T.D.** (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 3739-3744.
- Machesky, L.M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F.J., Grogan, A., Totty, N.F., Burlingame, A.L., Husan, A.L. and Segal, A.W.** (1997). Mammalian Arp2/3 complex localizes to regions of lamellipodia protrusion and is composed of evolutionary conserved proteins. *Biochem. J.* **328**, 105-112.
- MacLean-Fletcher, S. and Pollard, T.D.** (1980). Identification of a faction in conventional muscle actin preparation which inhibits actin filament self association. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **96**, 18-27.
- Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D. and Higgs, H.N.** (2001). Interaction of WASp/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 76-81.
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L. and Caligaris-Cappio, F.** (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* **72**, 830-833.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M.V., Teti, A. and Zambonin-Zallone, A.** (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* **99**, 1696-1705.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin Zallone, A. and Tarone, G.** (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* **169**, 202-214.
- May, R.C.** (2001). The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1607-1626.
- Miki, H. and Takenawa, T.** (1998). Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem. Res. Commun.* **243**, 73-78.
- Miki, H. and Takenawa, T.** (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J. Biochem.* **134**, 309-313.
- Miki, H., Miura, K. and Takenawa, T.** (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T.** (1998). Induction of filopodium formation by a WASp-related actin –depolymerising protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T.** (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-735.
- Miller, K.G.** (2002). Extending the Arp2/3 complex and its regulation beyond the leading edge. *J. Cell Biol.* **156**, 591-593.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. and Takenawa, T.** (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in podosome formation and degradation of extracellular Matrix in src-transformed fibroblasts. *Canc. Res.* **62**, 669-674.
- Molina, I.J., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F.S. and Remold-O'Donnell, E.** (1993). T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J. Immunol.* **151**, 4383-4390.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E.** (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6809-6822.



- Mullins, R.D.** (2000). How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 91-96.
- Mullins, R.D. and Pollard, T.D.** (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 244-249.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation high-affinity pointed end capping and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6181-6186.
- Nabi, I.R.** (1999). The polarization of the motile cell. *J. Cell Sci.* **112**, 1803-1811.
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T. and Miyamoto, S.** (2001). N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J. Cell Sci.* **114**, 1555-1565.
- Nobes, C.D and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H.** (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- Nonoyama, S. and Ochs, H.D.** (1998). Characterization of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and its role in the disease. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 407-412.
- Ochoa, G.-C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R. and De Camilli, P.** (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol.* **150**, 377-389.
- Ochs, H.D.** (1998). The Wiskott-Aldrich syndrome. *Sem. Haematol.* **35**, 332-345.
- Ochs, H.D.** (2002). The Wiskott-Aldrich syndrome. *IMAJ.* **4**, 379-384.
- Ory, S., Destaing, O. and Jurdic, P.** (2002). Microtubule dynamics differentially regulate Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polycaryons. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 351-362.
- Paduch, M., Jeleń, F. and Otlewski, J.** (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Act. Biochim. Pol.* **48**, 829-850.
- Paff, M. and Jurdic, P.** (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin  $\alpha V\beta 3$ . *J. Cell Sci.* **114**, 2775-2786.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, S.A. and Gundersen, G.G.** (2001). MDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* **3**, 723-729.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P. and Carlier, M.F.** (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* **2**, 385-391.
- Paunola, E., Mattila, P.K. and Lappalainen, P.** (2001). WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett.* **513**, 92-97.
- Pencev, D. and Grotendorst, G.R.** (1988). Human peripheral blood monocytes secrete a unique form of PDGF. *Oncogene Res.* **3**, 333-342.
- Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E.** (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30-33.
- Platt, N., da Silva, R.P. and Gordon, S.** (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**, 365-378.
- Pollard, T.D.** (1983). Measurement of rate constants for actin filament elongation in solution. *Anal. Biochem.* **134**, 406-412.

- Pollard, T.D.** (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754.
- Pollard, T.D.** (1999). Introduction to actin and actin-binding proteins. In: Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. ed. Kreis, T., Vale, R. Oxford, UK: *Oxford Univ. Press*. 2<sup>nd</sup> ed. pp3-11.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A.** (1984). Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profiling on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**, 6631-6641.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D.** (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545-576.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D.** (2001). Actin dynamics. *J. Cell Sci.* **114**, 3-4.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D. and Lim, W.A.** (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASp-Arp2/3 complex. *Science* **290**, 801-806.
- Pring, M., Weber, A. and Bubb, M.** (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* **31**, 1827-1836.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C.** (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed end association. *Science* **297**, 612-615.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G. and Steinberg, D.** (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**, 2995-2998.
- Rai, S.S. and Wolff, J.** (1996). Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 14707-14711.
- Ramesh, N., Anton, I.M., Hartwig, J.H. and Geha, R.S.** (1997). WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, induces actin polymerisation and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14671-14676.
- Reijo, R.A., Cooper, E.M., Beagle, G.J. and Huffaker, T.C.** (1994). Systematic mutational analysis of the yeast  $\beta$ -tubulin gene. *Mol. Biol. Cell* **5**, 29-43.
- Ridley, A. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Ridley, A.J.** (2001). Rho family proteins, coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471-177.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Rivero, L.O., Marcilla, A., Sameshima, J.H. and Robbins, K.C.** (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src-homology 3 domains. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5725-5731.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S. and Pollard, T.D.** (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-1684.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y. and Kirschner, M.W.** (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* **150**, 1299-1310.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M.W.** (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links CDC42-dependant signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.
- Rollins B.J.** (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **2**, 198-204.

- Rollins, B.J., Walz, A. and Baggiolini, M.** (1991). Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium influx and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* **78**, 1112-1116.
- Rosania, G.R. and Swanson, J.A.** (1996). Microtubules can modulate pseudopod activity from a distance inside macrophages. *Cell Motil. Cytoskel.* **34**, 230-245.
- Ruoslahti, E.** (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Bio.* **112**, 697-715.
- Safer, D. and Nachmias, V.T.** (1994). Beta Thymosins as actin binding peptides. *Bioessays* **16**, 473-479.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L. and Pellman, D.** (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* **4**, 626-631.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki, N., Miki, H. and Takenawa, T.** (2000). Arp2/3 complex-independent actin regulatory function of WAVE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 386-390.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B. and Cooper, J.A.** (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* **135**, 169-179.
- Schiff, P.B. and Horwitz, S.B.** (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1561-1565.
- Schindelhauer, D., Weiss, M., Hellebrand, H., Golla, A., Hergersberg, M., Seger, R., Belohradsky, B.H. and Meindl, A.** (1996). Wiskott-Aldrich syndrome: no strict genotype-phenotype correlations but clustering of missense mutations in the amino-terminal part of the WASP gene product. *Hum Genet.* **98**, 68-76.
- Schulte, R.J. and Sefton, M.** (2003). Inhibition of the activity of Src and Abl tyrosin protein kinases by the binding of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Biochem.* **42**, 9424-9430.
- Schwob, E. and Martin, R.P.** (1992). New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature* **355**, 179-182.
- Snapper, S.B., Rosen, F.S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C.H., Hagemann, T.L., Kwan, S.P., Ferrini, R., Davidson, L., Bhan, A.K. and Alt, F.W.** (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9**, 81-91.
- Snapper, S.B., Takeshima, F., Anton, I., Liu, C.H., Thomas, S.M., Nguyen, D., Dudley, D., Fraser, H., Purich, D., Lopez-Ila-saca, M., Klein, C., Davidson, L., Bronson, R., Mulligan, R.C., Southwick, F., Geha, R., Goldberg, M.B., Rosen, F.S., Hartwig, J.H. and Alt, F.W.** (2001). N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat. Cell Biol.* **3**, 897-904.
- Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J. and Scott, J.D.** (2003). Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1723-1728.
- Sogin, M.L.** (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Devel.* **1**, 457-463.
- Spradich, J.A. and Watt, S.** (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871.
- Starling, D.** (1976). Two ultrastructurally distinct tubulin paracrystals induced in sea-urchin eggs by vinblastine sulphate. *J. Cell Sci.* **20**, 79-89.
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Miko-shiba, K. and Takenawa T.** (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev. Cell* **3**, 645-658.

- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T.** (2001). Identification of another actin-related protein (Arp) 2/3 complex binding site in neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) that complements actin polymerization induced by the Arp2/3 complex activating (VCA) domain of N-WASP. *J. Biol. Chem.* **276**, 33175-33180.
- Suetsugu, S., Miura, H. and Takenawa, T.** (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 296-302.
- Sullivan, K.E., Mullen, C.A., Blaese, R.M. and Winkelstein, J.A.** (1994). A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Pediatr.* **125**, 876-885.
- Symons, M. and Settleman, J.** (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol.* **10**, 415-419.
- Takahashi, K., Naito, M. and Takeya, M.** (1996). Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol. Int.* **46**, 473-485.
- Takanari, H., Yosida, T., Morita, J., Izutsu, K. and Ito, T.** (1990). Instability of pleomorphic tubulin paracrystals artificially induced by Vinca alkaloids in tissue-cultured cells. *Biol. Cell* **70**, 83-90.
- Takenawa, T. and Miki, H.** (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* **114**, 1801-1809.
- Tal, T., Vaizel-Ohayon, D. and Schejter, E.D.** (2002). Conserved interactions with cytoskeletal but not signaling elements are an essential aspect of *Drosophila* Wasp function. *Dev. Biol.* **243**, 260-271.
- Tanaka, E. and Sabry, J.** (1995). Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* **83**, 171-176.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M. and Marchisio, P.C.** (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* **159**, 141-157.
- Teubner, A. and Wegner, A.** (1998). Kinetic evidence for a readily exchangeable nucleotide at the terminal subunit of the barbed ends of actin filaments. *Biochemistry* **37**, 7532-7538.
- Tian, L., Nelson, D.L. and Stewart, D.M.** (2000). Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich Syndrome protein to microtubules. *J. Biol. Chem.* **275**, 7854-7861.
- Tilney, L.G., Bonder, E.M. and DeRosier, D.J.** (1981). Actin filaments elongate from their membrane associated ends. *J. Cell Biol.* **90**, 485-494.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Uppuluri, S., Knipling, L., Sackett, D.L. and Wolff, J.** (1993). Localization of the colchicines-binding site of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11598-11602.
- Van den Ent, F., Amos, L.A. and Lowe, J.** (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton.. *Nature* **413**, 39-44.
- Vasiliev, J.M. and Gelfand, I.M.** (1976). Effects of colcemid on morphogenic processes and locomotion of fibroblasts. Cell Motility. R. Goldman, T. Pollard, und J. Rosenbaum, editors. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York, 279-304.
- Volkman, N., Amann, K.J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D.C., Hazelwood, L., Heuser, J.E., Li, R., Pollard, T.D. and Hanein D.** (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* **293**, 2456-2459.

- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **11**, 3044-3056.
- Waterman-Storer, C.M. and Salmon, E.D. (1999). Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 61-67.
- Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K. and Salmon, E.D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusions in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **1**, 45-50.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* **11**, 370-374.
- Weber, K., Pringle, R.J. and Osburn, M. (1972). Measurements of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gels. *Meth. Enzymol.* **26**, 3-27.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A. and Parsons, J.T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **151**, 29-40.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 247-288.
- Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997). The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J. Cell Biol.* **138**, 375-384.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**, 105-108.
- Wiskott, A. (1937). Familiärer, angeborener M. Werlhof? *Monatsschr. Kinderheilkd.* **68**, 2212-2216.
- Wittman, T. and Waterman-Storer, C.M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* **114**, 3795-3803.
- Worthylake, R.A. and Burridge, K. (2001). Leukocyte transendothelial migration: orchestration the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 569-577.
- Yamagata, M. and Kimata, K. (1994). Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J. Cell Sci.* **107**, 2581-2590.
- Yamaguchi, H., Miki, H., Suetsugu, S., Ma, L., Kirschner, M.W. and Takenawa, T. (2000). Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerisation and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12631-12636.
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N. and Takenawa, T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* **424**, 452-456.
- Zalevsky, J., Grigorova, I. and Mullins, R.D. (2001a). Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* actA protein. ActA binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 3468-3475.
- Zalevsky, J., Lempert, L., Kranitz, H. and Mullins, R.D. (2001b). Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr. Biol.* **11**, 1903-1913.
- Zallen, J.A., Cohen, Y., Hudson, A.M., Cooley, L., Wieschaus, E. and Schejter, E.D. (2002). SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **156**, 689-701.

- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M. and Marchisio, P.C.** (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: A  $\beta_3$  integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* **182**, 645-652.
- Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T., Hollenbaugh, D., Blaese, R.M., Kanner, S.B., Aruffo, A. and Ochs, H.D.** (1997). Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASp gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood* **90**, 2680 -2689.
- Zhu, Q., Zhang, M., Blaese, R.M., Derry, J.M., Junker, A., Francke, U., Chen, S.H. and Ochs, H.D.** (1995). The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* **86**, 3797-3804.
- Zicha, D., Allen, W.E., Brikell, P.M., Kinnon, C., Dunn, G.A., Jones, G.E. and Thrasher, A.J.** (1998). Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *British J. Haemat.* **101**, 659-665.
- Zigmond, S.H.** (2003). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 1-7.

## **DANKSAGUNG**

### **If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants**

Isaac Newton (1642-1727)  
englischer Naturwissenschaftler und Mathematiker

....deshalb danke ich ganz besonders:

Herrn Prof. Dr. P.C. Weber und Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die freundliche Aufnahme in das Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankheiten bzw. das Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, sowie eine Vielzahl hilfreicher Anregungen.

Herrn Prof. Dr. M. Aepfelbacher für die Fähigkeit seine Freude an der Forschung weiterzugeben, sein Interesse an der Arbeit seiner Doktoranden, seine kritischen Fragen, seine stetige Unterstützung, sowie unzählige hilfreiche Ideen.

Herrn PD Dr. S. Linder für die beste Doktorarbeitsbetreuung, die man sich vorstellen kann, viele inspirierende fachliche Diskussionen und freundschaftliche Gespräche.

Frau B. Böhlig für unzählige technische Hinweise und wertvolle Hilfe bei Proteinexpression, Makrophagenpräparation und eigentlich fast allem anderem.

Herrn Prof. Dr. T.D. Pollard, in dessen Labor am Salk Institut in LaJolla, USA die meisten der biochemischen Daten zur VC Region generiert wurden. Besonderer Dank an seine Mitarbeiter Prof. Dr. H.N. Higgs, Prof. Dr. L. Blanchoin und Dr. J.-B. Marchand. Sie erklärten mir mit viel Geduld die Grundlagen der Biochemie und des Surfens.

Dr. C. Jacobi vom Max von Pettenkofer-Institut für die Hilfe bei den Fluoreszenzmessungen zur VC Region.

Prof. Dr. H.N. Higgs, Hanover, USA; Prof. Dr. A. Hall, London, England; Prof. Dr. D. Nelson, NIH, Bethesda, USA; Dr. U. Wintergerst und Dr. M. Weiss München; Dr. P. Westermann, Berlin; Prof. Dr. D.M. Stewart, NIH, Bethesda, USA für die großzügige Überlassung von Antikörpern, Konstrukten und Patientenzellen.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe und der beiden Institute für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Andi, Georg und Christian für technische Hilfe bei Computer- und Kaffee Problemen und Thorsten aus Saarbrücken für die Computerproblem-Ferndiagnostik.

Meinen Eltern und meiner Schwester, weil sie die Besten sind, und meiner Oma, weil sie alle meine "Papers" liest.

Lars dafür, dass er bereit war, meine Liebe mit Millionen von Makrophagen zu teilen.

# LEBENS LAUF

Katharina Hübner  
 Reitmorstr. 7, App. 28  
 80538 München  
 Tel: 0178-4148850  
 089-21024690  
 e-mail: katharinahuefner@hotmail.com

## PERSÖNLICHE DATEN

16. Oktober 1976	Geboren in Saarbrücken als Tochter von Frau Christiane Hübner und Herrn Stefan Hübner
------------------	---

## SCHULBILDUNG

1987-1996	Nach der Grundschule Besuch des Willi-Graf-Gymnasiums in Saarbrücken Sprachenfolge: Latein, Französisch, Englisch, Alt-Griechisch 3 Schuljahre im Ausland: <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cambridge (Großbritannien)</li> <li>■ Fribourg (Schweiz)</li> <li>■ Asheville (USA)</li> </ul>
18. Juni 1996	Abitur am Willi-Graf-Gymnasium, Note: sehr gut (1.1)

## HOCHSCHULBILDUNG

September 1996-Oktober 1998	Zulassung zum Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Juli 1997-August 1997 Praktikum an der Royal Infirmary, Aberdeen, Schottland</li> <li>■ 18.9.1998 Physikum in Freiburg, Note: sehr gut (1.0)</li> </ul>
Oktober 1998-November 2003	Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität, München <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 31.8.1999 1. Staatsexamen in München, Note: sehr gut (1.0)</li> <li>■ 31.5.2002 USMLE Step1, 257 pts (99 Perzentile)</li> <li>■ 6.9.2002 2. Staatsexamen in München, Note: sehr gut (1.0)</li> <li>■ 18.11.2003 3. Staatsexamen in München, Note: sehr gut (1.0)</li> </ul>

## FAMULATUREN UND KURSE

September 1998-Oktober 1998	Famulatur in der Caritas Klinik, Saarbrücken Fachbereich: Gynäkologie und Geburtshilfe
März 1999-April 1999	Famulatur am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen, Klinikum Innenstadt Fachbereich: Innere Medizin
März 2000-April 2000	Famulatur am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie Fachbereich: Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
Februar 2001-April 2001	Famulatur am WHO-Health-Center in Nuuk, Grönland Fachbereich: Allgemeinmedizin und Public Health
April 2001	IPOKRATES Kurs in Neurologie ("Bedside Teaching") mit Prof. Dr. D. Krainc von der Harvard Medical School, Boston, MA, USA und Prof. Dr. Haberl vom Krankenhaus München Harlaching am Krankenhaus München Harlaching
August 2001-Oktober 2001	Famulaturen in Australien (Stipendium des Deutschen Famulantenaustauschs) <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ayr Hospital, Ayr, Queensland</li> </ul> Fachbereiche: Chirurgie und Geburtshilfe



	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rockingham and Kwinana District Hospital, Perth, Western Australia Fachbereich: Anästhesie und Notfallmedizin</li> </ul>
Februar 2002	IPOKRATES Kurs in Pädiatrie ("Bedside Teaching") mit Prof. Dr. D. Wittenberg von der University of Pretoria, Pretoria, South Africa und Dr. R. Hofweber vom Kinderkrankenhaus St. Marien in Landshut im Kinderkrankenhaus St. Marien

## PRAKTISCHES JAHR

Oktober 2002-Februar 2003	Innere Medizin <ul style="list-style-type: none"> <li>2 Monate Mount Sinai School of Medicine, NYC, NY, USA</li> <li>2 Monate Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA</li> </ul> Rotation über folgende Stationen und Ambulanzen: allgemeine innere Krankheiten, Immunologie/Allergologie, klinische Infektiologie, Transplantationsmedizin, Hämatologie/Onkologie
Februar 2003-Juni 2003	Neurologie am National Hospital for Neurology and Neurosurgery at Queen Square, London, Großbritannien
Juni 2003-September 2003	Chirurgie am Krankenhaus München-Harlaching

## FORSCHUNGSTÄTIGKEIT

Oktober 1999-Oktober 2002	Doktorarbeit unter Prof. Dr. M. Aepfelbacher am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie und Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen (Stipendium des DFG-Graduiertenkollegs "Vaskuläre Biologie in der Medizin" GK438)
August 2000-Oktober 2000	Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. T.D. Pollard am "Salk Institute for Biological Studies" in LaJolla, CA, USA (Graduiertenstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdiensts, DAAD)
November 2001-Dezember 2001	Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. L. Blanchoin, CEA/CNRS, Grenoble, Frankreich

## STIPENDIEN UND AUSZEICHNUNGEN

- Stipendium des Graduiertenkollegs "Vaskuläre Biologie in der Medizin" GK438 im Rahmen meiner Doktorarbeit
- Graduiertenstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdiensts (DAAD) für meinen Forschungsaufenthalt am Salk Institute in LaJolla, CA, USA
- 28.6.2001 Teilnahme am "Benjamin-Franklin-Contest" in Berlin (Wettbewerb für Medizinstudenten, bei dem Teams aus verschiedenen Universitäten gegeneinander in Bereichen wie Diagnosefindung und praktische Fähigkeiten gegeneinander antreten): 2. Platz
- Stipendium des Deutschen Famulantenwechsels für meine Famulaturen in Australien
- Online-Stipendium bei e-fellows.net

## WEITERES ENGAGEMENT

Oktober 1996-Oktober 1998	Mitarbeit in der Fachschaft der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg
Februar 2001-heute	Mitarbeit bei IPOKRATES (International Postgraduate Organisation for Knowledge Transfer and Teaching Excellent Students, <a href="http://www.ipokrates.de">www.ipokrates.de</a> ). Besuch und später Organisation mehrerer Seminare mit ausländischen Professoren unter anderem von der Harvard Medical School, Yale Medical School, University of California San Francisco und der University of Pretoria. Seit 2001 Mitglied im Vorstand von IPOKRATES Students

## TAGUNGSBEITRÄGE

### Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

-Originalarbeiten und Sekundärliteratur:

Siehe Auflistung am Anfang der Arbeit.

-Poster und Vorträge mit gedruckten "Abstracts":

1. **Hüfner, K.**, Aepfelbacher, M. and Linder, S. (2000). Regulation of podosomal adhesion structures in human macrophages. *Symposium Biologie des vaskulären Endothels und 2. Satusseminar Graduiertenkolleg 438*, Herrsching, Abstract 2.
2. Linder, S., Higgs, H.N., **Hüfner, K.**, Schwarz, K., Pannicke, U. and Aepfelbacher, M. (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *51. Mosbacher Kolloquium: GTP binding proteins: central regulators in cell biology*, Mosbach, Abstract P80.
3. Linder, S., Higgs, H.N., **Hüfner, K.**, Schwarz, K., Pannicke, U. and Aepfelbacher, M. (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*, München, Abstract 15.K.2.11.
4. Linder, S., **Hüfner, K.**, Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *Research Festival*, Klinikum Großhadern, Abstract P56.
5. Linder, S., **Hüfner, K.**, Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *40<sup>th</sup> meeting of the American Society for Cell Biology*, San Francisco, *Mol. Biol. Cell* 11, suppl. 351a, Abstract 1819.
6. Linder, S., **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D. and Aepfelbacher, M. (2001). Cooperation between multiple domains in CDC42Hs effector WASp regulates Arp2/3 complex-dependent actin polymerization in primary human macrophages. *6. Kolloquium des DFG Forschungsschwerpunktes „GTPasen als zentrale Regulatoren zellulärer Funktionen“*, Berlin, Abstract 21.
7. **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D., Aepfelbacher, M. and Linder, S. (2001). The VC region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *41<sup>th</sup> meeting of the American Society for Cell Biology*, Washington, *Mol. Biol. Cell* 12, suppl. 285a, Abstract 1559.
8. Linder, S., **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D., Schell, B. and Aepfelbacher, M. (2002). Cooperation between different WASp domains regulates Arp2/3 complex-dependent actin

polymerization in primary human macrophages. *2<sup>nd</sup> Munich Symposium on Cell Dynamics*, Munich, Abstract T18.

9. Linder, S., **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D., Schell, B. and Aeppelbacher, M. (2002). Cooperation of WASp domains regulates Arp2/3 complex-dependent actin polymerization in macrophages. *42th meeting of the American Society for Cell Biology*, San Francisco, Abstract L90.

10. Linder, S., **Hüfner, K.**, Higgs, H.N., Pollard, T.D., Schell, B., Aeppelbacher, M. (2003). Cooperation between WASp domains regulates Arp2/3 complex-dependent actin polymerization in macrophages. *26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie*, Bonn, *Eur. J. Cell Biol.* 82, suppl. 53, Abstract MS4-20.

---

**Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht  
mit einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen**

Hermann Hesse (1877-1962)  
deutscher Schriftsteller und Dichter, 1946 Nobelpreis für Literatur